

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire FLAMEL0056	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00513	Date du dépôt international (jour/mois/année) 01/03/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 02/03/1999
Déposant FLAMEL TECHNOLOGIES et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/00513

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR00/00513 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: August 1, 2001

Signature of Director :



For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 08 novembre 2000 (08.11.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00513	Référence du dossier du déposant ou du mandataire FLAMEL0056
Date du dépôt international (jour/mois/année) 01 mars 2000 (01.03.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 02 mars 1999 (02.03.99)
Déposant NICOLAS, Florence etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

18 septembre 2000 (18.09.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Sean Taylor no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/00513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/78 C07K1/107 A61L24/10 A61L27/24 A61L15/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 January 1999 (1999-01-13) page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; examples 1-5	1-3,8
A	--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 abstract; RN 60-23-1 * idem * & Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- -/--	1,4,5,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2000

Date of mailing of the international search report

14/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Amsterdam, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/00513

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 the whole document	1, 4-6, 8, 9
A	WO 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 May 1990 (1990-05-31) cited in the application examples	1, 7, 8, 11, 12
A	FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 December 1993 (1993-12-24) cited in the application claims 1-6, 19	1, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

onal Application No

PCT/FR 00/00513

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 890663	A	13-01-1999	JP 11323727 A	26-11-1999
			CN 1207422 A	10-02-1999
<hr/>				
WO 9005755	A	31-05-1990	US 5162430 A	10-11-1992
			AT 168708 T	15-08-1998
			AU 638687 B	08-07-1993
			AU 4660989 A	12-06-1990
			CA 2003538 A	21-05-1990
			DE 68928754 D	27-08-1998
			DE 68928754 T	14-01-1999
			EP 0444157 A	04-09-1991
			ES 2119743 T	16-10-1998
			JP 2505312 B	05-06-1996
			JP 4502027 T	09-04-1992
			US 5306500 A	26-04-1994
			US 5510418 A	23-04-1996
			US 5565519 A	15-10-1996
			US 5376375 A	27-12-1994
			US 5413791 A	09-05-1995
			US 5475052 A	12-12-1995
			US 5550187 A	27-08-1996
			US 5523348 A	04-06-1996
			US 5446091 A	29-08-1995
			US 5543441 A	06-08-1996
			US 5470911 A	28-11-1995
			US 5476666 A	19-12-1995
			US 5510121 A	23-04-1996
			US 5527856 A	18-06-1996
			US 5614587 A	25-03-1997
			US 5550188 A	27-08-1996
			US 5643464 A	01-07-1997
			US 5936035 A	10-08-1999
			US 5800541 A	01-09-1998
			US 5786421 A	28-07-1998
			US 5744545 A	28-04-1998
			US 5324775 A	28-06-1994
			US 5328955 A	12-07-1994
			US 5264214 A	23-11-1993
			US 5308889 A	03-05-1994
			US 5292802 A	08-03-1994
			US 5304595 A	19-04-1994
<hr/>				
FR 2692582	A	24-12-1993	AT 160798 T	15-12-1997
			DE 69315483 D	15-01-1998
			DE 69315483 T	02-07-1998
			EP 0575273 A	22-12-1993
			ES 2113511 T	01-05-1998
			JP 6080935 A	22-03-1994
			US 5412076 A	02-05-1995
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 00/00513

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/78 C07K1/107 A61L24/10 A61L27/24 A61L15/32

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 janvier 1999 (1999-01-13) page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; exemples 1-5 ---	1-3,8
A	DATABASE CHEMABS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 abrégé; RN 60-23-1 * idem * & Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- -/--	1,4,5,9



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 juillet 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Amsterdam, L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/00513

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 le document en entier ---	1,4-6,8, 9
A	WO 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 mai 1990 (1990-05-31) cité dans la demande exemples ---	1,7,8, 11,12
A	FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 décembre 1993 (1993-12-24) cité dans la demande revendications 1-6, 19 -----	1,12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

≥ Internationale No

PCT/FR 00/00513

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 890663	A	13-01-1999	JP 11323727 A	26-11-1999
			CN 1207422 A	10-02-1999
<hr/>				
WO 9005755	A	31-05-1990	US 5162430 A	10-11-1992
			AT 168708 T	15-08-1998
			AU 638687 B	08-07-1993
			AU 4660989 A	12-06-1990
			CA 2003538 A	21-05-1990
			DE 68928754 D	27-08-1998
			DE 68928754 T	14-01-1999
			EP 0444157 A	04-09-1991
			ES 2119743 T	16-10-1998
			JP 2505312 B	05-06-1996
			JP 4502027 T	09-04-1992
			US 5306500 A	26-04-1994
			US 5510418 A	23-04-1996
			US 5565519 A	15-10-1996
			US 5376375 A	27-12-1994
			US 5413791 A	09-05-1995
			US 5475052 A	12-12-1995
			US 5550187 A	27-08-1996
			US 5523348 A	04-06-1996
			US 5446091 A	29-08-1995
			US 5543441 A	06-08-1996
			US 5470911 A	28-11-1995
			US 5476666 A	19-12-1995
			US 5510121 A	23-04-1996
			US 5527856 A	18-06-1996
			US 5614587 A	25-03-1997
			US 5550188 A	27-08-1996
			US 5643464 A	01-07-1997
			US 5936035 A	10-08-1999
			US 5800541 A	01-09-1998
			US 5786421 A	28-07-1998
			US 5744545 A	28-04-1998
			US 5324775 A	28-06-1994
			US 5328955 A	12-07-1994
			US 5264214 A	23-11-1993
			US 5308889 A	03-05-1994
			US 5292802 A	08-03-1994
			US 5304595 A	19-04-1994
<hr/>				
FR 2692582	A	24-12-1993	AT 160798 T	15-12-1997
			DE 69315483 D	15-01-1998
			DE 69315483 T	02-07-1998
			EP 0575273 A	22-12-1993
			ES 2113511 T	01-05-1998
			JP 6080935 A	22-03-1994
			US 5412076 A	02-05-1995
<hr/>				



1
2
3

4
5
6

PEPTIDES COLLAGENIQUES MODIFIES PAR GREFFAGE DE FONCTIONS
MERCAPTO, L'UN DE LEURS PROCEDES D'OBTENTION
ET LEURS APPLICATIONS COMME BIOMATERIAUX.

La présente invention concerne de nouveaux peptides collagéniques chimiquement modifiés par greffage de fonctions thiols libres ou substituées, portées par des restes mercaptoaminés. Lorsque les peptides collagéniques comportent des fonctions thiol, ils ont la propriété d'être réticulables par oxydation et conduisent à un dérivé de collagène réticulé par des ponts disulfures.

L'invention vise également un procédé de préparation de ces nouveaux dérivés de collagène qui sont sous forme réticulable, sous forme d'un précurseur du dérivé réticulable ou bien encore sous forme réticulée.

L'invention a également trait aux applications de ces nouveaux peptides collagéniques à titre de biomatériaux utiles comme matières premières pour la fabrication de produits médicaux, chirurgicaux ou cosmétiques, tels que les tissus ou les organes artificiels, la peau artificielle, les prothèses ou implants osseux, ligamentaires, cardio-vasculaires, intra-oculaires, intrapéritonéaux ... ou bien encore les systèmes de bioencapsulation (implants, microsphères, microcapsules) permettant la libération prolongée et contrôlée de principes actifs in vivo. Les accessoires médicaux tels que les fils de suture ainsi que les revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables, constituent d'autres illustrations des possibilités d'application des nouveaux biomatériaux selon l'invention.

Au sens de la présente invention, le terme peptide collagénique désigne notamment le collagène avec ou sans télépeptides, le collagène dénaturé ainsi que la gélatine.

On trouve sur le marché différentes qualités commerciales de collagène, avec ou sans télépeptides. Ces collagènes commerciaux peuvent être d'origine humaine ou animale.

Le collagène est une protéine connue, présente à tous les niveaux de l'organisation des tissus animaux : il s'agit de la principale protéine de la peau et des tissus conjonctifs.

Par nature, il possède des caractéristiques biochimiques et physico-chimiques relativement bien adaptées pour des utilisations en tant que biomatériaux. Ces caractéristiques sont, notamment : bonne biocompatibilité, biodégradabilité, caractère hémostatique ...

Cependant, force est de constater que les articles médicaux, chirurgicaux ou cosmétiques implantables à base de collagène souffrent de certaines lacunes. Leurs caractéristiques mécaniques sont faibles et rendent leur manipulation délicate, voire les rendent inutilisables pour certaines applications. De plus, leur biodégradation peut être trop rapide lorsque les implants doivent exercer des fonctions palliatives et/ou curatives pour de longues périodes. Pour améliorer les caractéristiques mécaniques et de biodégradation des implants à base de collagène, il s'avère nécessaire de le modifier chimiquement, en particulier de le réticuler.

Pour modifier, en particulier réticuler, des peptides collagéniques, on utilise les fonctions réactives présentes sur les chaînes latérales de certains acides aminés du collagène, à savoir :

- les fonctions amines des résidus lysine, représentant en nombre 3 % des acides aminés,
- les fonctions acides carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques, représentant en nombre 9 à 12 % des acides aminés,
- les fonctions alcool des résidus sérine, thréonine et hydroxyproline, représentant en nombre 14 % des acides aminés.

C'est ainsi que sont apparus quatre grands types de techniques de réticulation artificielle de ce peptide collagénique.

1. Création d'un réseau par liaisons covalentes entre les molécules de collagène, par irradiation, déshydratation poussée. Cette réticulation est obtenue sans fonctionnalisation chimique du collagène.
2. Activation des groupements naturels du collagène, pour introduire la possibilité d'autoréticulation, par exemple par oxydation (périodate) ou par activation fonctionnelle (activation des acides par des carbodiimides, sous forme d'azide ... qui réagissent avec les amines).
3. Réticulation à l'aide d'agents chimiques pontants bi- ou poly-fonctionnels (aldéhydes, composés dicarboxyliques, diamines, diisocyanates, disulfonyl-chlorures, polyéthylèneglycol difonctionnalisé).
4. Copolymérisation par liaisons covalentes du collagène avec un autre polymère (polyacrylique, copolyacrylonitrile-styrène, polyuréthane, polyalcool, silicone).

Une variante de la réticulation de type 3. par pontage peut consister à mettre en œuvre des dérivés difonctionnels contenant des groupements disulfure. Cette variante est celle à laquelle on s'intéresse dans le cadre de l'invention. Ladite variante a donné lieu, dans l'art antérieur, à diverses propositions techniques, qui vont être présentées ci-après.

L'article de F. SCHADE & H. ZAHN [Einbau von cystin-brücken in Kollagen, Angew. Chem., 74, 904, 1962], décrit la fonctionnalisation de collagène à l'aide d'un dérivé de la cystine, par formation de liaisons amides entre, d'une part, les motifs NH_2 libres des résidus lysine de la chaîne collagénique et, d'autre part, les motifs carboxyles du dérivé de cystine, préalablement activés par estérification à l'aide de nitrophénol. La réduction des ponts disulfure des dérivés de cystine greffés conduit à un matériau thiolisé réticulable par oxydation. Dans la mesure où seuls les résidus lysine du collagène sont fonctionnalisés, le taux maximal de fonctionnalisation,

directement proportionnel au niveau de réticulation, est au maximum de 3 % en nombre.

La demande de brevet européen EP 0 049 469 divulgue la fonctionnalisation de collagène soluble extrait de tendons à l'aide de N-acétyl
5 homocystéine thiolactone. Il s'agit là encore d'une réaction entre les motifs carboxyles de l'agent de fonctionnalisation et les motifs amine des résidus lysine du collagène. Le taux maximum de fonctions thiols greffées est donc là aussi au maximum de 3%.

Pour obtenir de nouveaux dérivés collagéniques thiolés et/ou pour
augmenter les taux de greffage de fonctions thiols sur le collagène et par suite le
10 niveau de réticulation, la demanderesse a proposé, en son temps, trois nouvelles voies de fonctionnalisation chimique du collagène par des groupements porteurs de fonctions thiols ou des précurseurs de ceux-ci.

La première voie est décrite dans le brevet français FR 2 692 582 qui concerne un collagène greffé avec des dérivés thiolés (cystéine, homocystéine, cystéamine) :

- 15 - par l'intermédiaire d'une rotule succinique dont l'une des extrémités carboxyle a réagi avec des motifs amine des résidus lysine et avec certains motifs alcool des résidus sérine thréonine et hydroxyproline du collagène et dont l'autre extrémité carboxyle a réagi avec le motif amine du dérivé thiolé;
- et éventuellement directement sans rotule sur les fonctions carboxyle des
20 acides aspartiques et glutamiques du collagène.

On peut ainsi atteindre jusqu'à 29 % de fonctionnalisation des acides aminés du collagène.

Les fonctions mercaptoaminées - c'est-à-dire les dérivés thiolés - décrites dans ce brevet français, sont fixées directement ou indirectement sur les fonctions NH₂, OH et
25 COOH libres du collagène. Ce brevet ne divulgue pas de peptide collagénique dont les motifs OH et NH₂ sont fonctionnalisés par d'autres fonctions que des fonctions mercaptoaminées.

La deuxième voie est donnée dans le brevet FR 2 699 184 ayant trait à un collagène greffé avec des dérivés thiolés (cystéine, homocystéine) fixés directement
30 sur les motifs amine des résidus lysine et certains motifs alcool des résidus sérine, thréonine et hydroxyproline. Conformément à l'invention décrite par ce brevet, l'agent de fonctionnalisation (e.g. cystine) précurseur du dérivé thiolé greffé sur le collagène comprend une fonction carboxyle activée, réagissant avec les NH₂ des lysines pour former des amides et avec les OH des sérines, thréonines et hydroxyprolines pour
35 former des esters. Cet agent de fonctionnalisation comprend également une fonction amine protégée, qui ne peut pas réagir avec les carboxyles des acides aspartique et

glutamique de la chaîne collagénique. Le taux maximum de greffage que l'on peut atteindre par cette méthode est de 17 %.

Une troisième voie de modification chimique du collagène mise au point par la demanderesse pour apporter une fonctionnalité réticulante à un tel polymère, est décrite dans le brevet français FR 2 723 957. Ce brevet divulgue un collagène greffé sur les motifs amine libres de ses résidus lysine, par un dérivé thiolé constitué par de la cystéine ou de l'homocystéine dont les fonctions amine et thiol sont protégées par un seul et même groupement protecteur, l'ensemble formant un motif thiazolidine. L'acide carboxylique du dérivé thiazolidine est activé pour pouvoir réagir avec les fonctions amines des résidus lysine. En conséquence, le taux de greffage est ici d'au maximum 3 %. Les fonctions carboxyliques libres des acides glutamiques et aspartiques de la chaîne collagénique ne sont pas substituées dans le collagène selon ce brevet.

Les collagènes selon ces trois brevets français permettent la préparation d'articles médicaux (gels, feutres, films ...) présentant des niveaux de réticulation, c'est-à-dire des caractéristiques mécaniques et de biodégradation, intéressantes. Ils restent cependant perfectibles.

On connaît par ailleurs des collagènes substitués par des groupements qui ne sont pas des fonctions de réticulation et qui sont destinés à procurer au collagène d'autres propriétés, par exemple en modulant ses caractéristiques de solubilité et/ou ses caractéristiques rhéologiques et/ou ses caractéristiques biologiques. C'est ainsi que la demande de brevet PCT WO 90/05755 décrit un collagène, dont les amines des résidus lysine qu'il comprend, sont substituées par une chaîne polymère hydrophile synthétique et plus particulièrement par du monométhylPolyEthylèneGlycol. Ce collagène-PEG est présenté comme ayant une immunogénicité réduite et des propriétés mécaniques d'élasticité et de malléabilité améliorées.

La demande de brevet PCT WO 94/01483 divulgue quant à elle un matériau polymère conjugué biocompatible, biologiquement inerte, formé par un polymère naturel tel que le collagène, lié par une liaison éther à un polymère hydrophile synthétique tel que le polyéthylèneglycol (PEG).

Les collagènes modifiés selon l'art antérieur ne procurent pas toutes les satisfactions souhaitables, quand à leurs propriétés mécaniques, leurs cinétiques de dégradation *in vivo* et leurs caractéristiques biologiques. Par ailleurs, les collagènes connus et modifiés par des fonctions thiols libres ou substituées restent encore perfectibles, en ce qui concerne le contrôle, au travers du taux de réticulation, de leurs caractéristiques mécaniques et biologiques.

Enfin, les formes réticulables des collagènes modifiés connus gagneraient à posséder des propriétés de solubilité dans une large gamme de pH, de façon à faciliter leur mise en œuvre et ce sans que cela ne porte préjudice à leur niveau de réticulation.

Dans cet état de l'art, l'un des objectifs essentiels de l'invention est de
5 fournir de nouveaux collagènes modifiés par greffage de fonctions thiols, libres ou substituées, ces nouveaux collagènes se devant d'être aptes à réticuler de manière suffisante et contrôlée, par formation de ponts disulfure intercaténares.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouveaux collagènes modifiés par greffage de fonctions thiols et caractérisés par de forts taux de
10 greffage coexistant avec une bonne solubilité dans une large gamme de pH.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouveaux collagènes modifiés par greffage de fonctions thiols et faciles à mettre en œuvre et à manipuler industriellement.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouveaux
15 collagènes modifiés par greffage de fonctions thiols, dans lesquels les fonctions réactives ne sont pas toutes mobilisées par la réticulation, de manière à permettre le greffage de fonctionnalités non-réticulantes.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouveaux collagènes réticulables ou des précurseurs de collagène réticulable mercapto-
20 fonctionnalisés et transformables en gels, films ou feutres (e. g.) de densité de réticulation (donc de résistance mécanique et de biodégradation) modulables à l'avance, de façon à fournir un éventail varié de matières premières utilisables dans de nombreuses applications comme biomatériaux..

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un procédé simple
25 pour la préparation d'un peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiols libres ou substituées et portées par des restes mercaptoaminés.

Les inventeurs ont eu le mérite d'atteindre tous ces objectifs, parmi d'autres en mettant à jour le fait qu'il convenait de privilégier les fonctions carboxyliques des acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique, en tant
30 que sites de greffage de fonctions mercaptoaminées à l'origine des propriétés de réticulation par pontage S-S entre les chaînes de collagène.

Ainsi, la présente invention concerne, tout d'abord, un peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiol libres ou substituées, portées par des restes mercaptoaminés, caractérisé en ce que ces restes mercaptomaminés sont identiques
35 ou différents entre eux et sont exclusivement greffés sur les acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique par l'intermédiaire de liaisons amides, et en ce que ledit peptide collagénique modifié est soluble en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires.

Le fait que les fonctionnalités de réticulation soient portées par les restes carboxyle des acides aspartique et glutamique, confère au peptide collagénique selon l'invention des propriétés avantageuses tout à fait inattendues sur le plan mécanique et biologique. En effet, ce peptide collagénique, modifié peut, dès lors qu'il se trouve
5 sous forme réduite thiol, être réticulé de manière contrôlée, en atteignant des taux de réticulation lui procurant la stabilité ainsi que de bonnes propriétés mécaniques et une biodégradabilité modulable. De plus, les résidus lysine n'étant pas impliqués dans le greffage des résidus mercaptoaminés, ils peuvent servir de sites d'ancrage pour d'autres groupements et procurer au produit des fonctionnalités diverses et variées
10 utiles dans les applications visées.

Dans le cas où le peptide collagénique correspond à du collagène natif avec ou sans télépeptide, le taux de fonctionnalisation par des restes mercaptoaminés peut atteindre 9 à 12 % en nombre, puisque cela correspond au ratio d'acides aminés de type acide aspartique ou acide glutamique constitutifs du collagène. Sont
15 comptabilisés dans ce ratio, les asparagines et les glutamines dont les amides sont susceptibles d'être hydrolysés pour former les dérivés acides correspondants.

Suivant une caractéristique avantageuse de l'invention, ce taux élevé de greffage n'est pas incompatible avec une solubilité importante des formes réticulables (non-réticulées) du collagène modifié, en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires et
20 dans une large gamme de pH. Cela lui confère une grande facilité de mise en oeuvre.

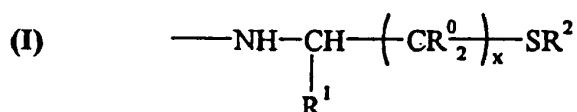
Pour pouvoir réticuler par pontage disulfure les fonctionnalités mercaptoaminées modifiées selon l'invention doivent se trouver sous forme réduite, c'est-à-dire sous forme thiol $-(SH)$. C'est donc lorsqu'ils seront sous cette forme que
25 l'on pourra qualifier les peptides collagéniques modifiés de "réticulables". Ce terme traduit l'aptitude des peptides collagéniques modifiés à s'autoréticuler spontanément en présence de l'oxygène de l'air, à température ambiante et éventuellement en présence d'agents auxiliaires tels que des oxydants.

Les restes mercaptoaminés porteurs des fonctions de réticulation de type thiol libre ou de leurs précurseurs sous forme thiol substitué, sont avantageusement des résidus qui dérivent de près ou de loin de la cystéine ou de ses analogues : cystéamine et homocystéine. Il est intéressant de noter que ces différents résidus mercaptoaminés sont de nature biologique.
30

Dans le présent exposé, on distingue deux types de restes monovalents mercaptoaminés ou greffons, à savoir ceux porteurs de fonctions thiol directement réticulables et ceux porteurs de fonctions mercapto précurseurs desdites fonctions thiol.
35

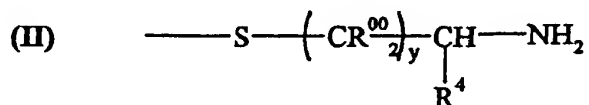
S'agissant des mercaptans précurseurs de thiols, ils déterminent une *première sous famille* de peptides collagéniques modifiés selon l'invention caractérisé en ce qu'au moins une partie des restes mercaptoaminés, greffés sur les acides carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques, répond à la formule générale (I)

5 suivante :



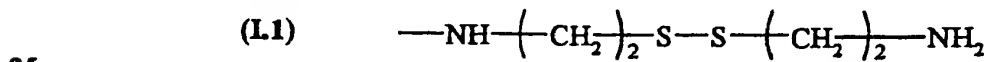
dans laquelle :

- $x = 1$ ou 2 ;
- $\text{R}^0 = \text{H}$ ou CH_3 ;
- 10 • R^1 représente H ou COOR^3 avec R^3 correspondant à un radical hydrocarboné de type aliphatique, aromatique ou alicyclique, de préférence alkylrique, alcénylique, arylique, aralkylique, alkylarylique, aralcénylique, alcénylarylique et, plus préférentiellement encore, de type méthylique ou éthylique ;
- 15 • R^2 est un radical aliphatique et/ou alicyclique et/ou aromatique, de préférence un alkyle ou un acyle éventuellement soufré et/ou aminé, et plus préférentiellement encore R^2 répond à la formule (II) suivante :

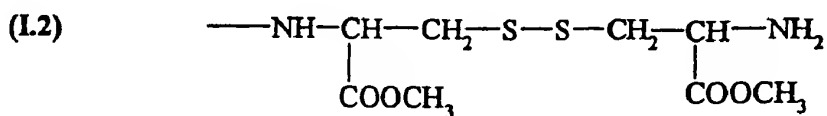


20 avec y , R^{00} et R^4 répondant à la même définition que celle donnée en légende dans la formule (I) pour x , R^0 et R^1 .

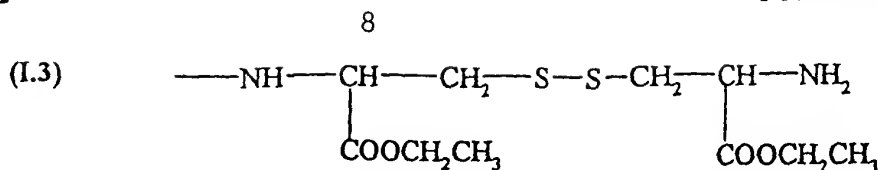
Plus précisément, les restes mercaptoaminés greffés de ces peptides collagéniques, non immédiatement réticulables, sont choisis dans le groupe des radicaux monovalents comprenant :



25



30



Ce sont des greffons dérivant de la cystine et comprenant donc un pont disulfure réductible à l'aide d'agents réducteurs connus tels que des mercaptans (mercaptoéthanol, acide mercaptoacétique, mercaptoéthylamine, benzylmercaptan, thiorésol, dithiothréitol...) et/ou des sels réducteurs (NaBH_4 , Na_2SO_3 ...) et/ou des réducteurs organiques (phosphine).

Ces nouveaux intermédiaires collagéniques modifiés selon cette *première sous-famille*, sont stables et solubles dans l'eau et plus généralement en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires. En outre, ils sont aisément purifiables et isolables, ce qui en fait des produits pratiques à conditionner, à stocker et à mettre en oeuvre.

10

La *deuxième sous-famille* de peptides collagéniques modifiés selon l'invention regroupe ceux dont les carboxyles des acides glutamique et aspartique ont réagi avec les fonctions amines des restes mercaptoaminés de formule (I) dans lesquels le substituant R^2 correspond à l'hydrogène.

Les peptides collagéniques modifiés selon la *deuxième sous-famille* peuvent être préparés par réduction des peptides collagéniques selon la *première sous-famille*, à l'aide d'agents réducteurs, tels que ceux définis ci-dessus.

Ces peptides collagéniques réduits sont aisément purifiables et isolables. Dès lors qu'ils sont obtenus sous forme sèche après un isolement en milieu acide, ces peptides sont stables. Enfin, ils sont solubles dans l'eau et plus généralement en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires et ils sont aisés à mettre en oeuvre.

Les restes mercaptoaminés de ces peptides à fonction thiol libres sont définis par la formule (I') suivante :



dans laquelle R^1 peut correspondre à H ou COOR^3 , avec x, R^1 , R^0 , R^3 tels que définis supra et, en outre, R^3 peut représenter l'hydrogène ou un cation pour former un sel avec COO^- , ce cation étant, de préférence, Na^+ , K^+ , Li^+ , dans le cas où l'on prévoit une étape de déprotection de l'ester. Le greffon ainsi mis en oeuvre dérive directement de la cystéine.

Les peptides collagéniques comprenant de tels restes mercaptoaminés à fonctions réactives thiol ont pour caractéristique d'être réticulables au sens de l'invention.

La réticulation s'opère par oxydation des thiols en ponts disulfures, ce qui permet d'obtenir un réseau collagénique tridimensionnel réticulé chimiquement, insoluble dans les milieux physiologiques et parfaitement stable. Cette oxydation peut être obtenue

e.g. par l'oxygène de l'air en milieu faiblement basique, par l'eau oxygénée, ou par des dérivés iodés (iode, bétadine).

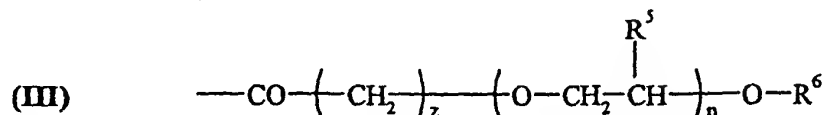
Parmi les peptides collagéniques modifiés conformes à l'invention, on peut isoler ceux qui existent sous forme réticulée et qui composent une *troisième sous*
5 *famille* de peptides collagéniques comprenant des chaînes collagéniques reliées entre elles par des ponts disulfure, dont les atomes de soufre constitutifs appartiennent à des restes mercaptoaminés greffés sur les acides aspartique et glutamique des chaînes collagéniques, exclusivement par l'intermédiaire de liaisons amides.
Ces peptides collagéniques réticulés de la *troisième sous-famille* peuvent être
10 obtenus, avantageusement, à partir des peptides collagéniques modifiés de la *deuxième sous-famille*.

Ces peptides collagéniques réticulés sont des produits nouveaux, stables et dont les qualités mécaniques et biologiques en font des biomatériaux de choix pour la
15 réalisation d'articles médicaux ou chirurgicaux tels que des implants, des prothèses, des pansements ou bien encore de la peau artificielle. Dans la mesure où il est possible de jouer sur le taux de substitution des motifs carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques, on dispose d'une certaine marge de manoeuvre pour choisir la qualité mécanique et vitesse de biodégradation appropriées.

Par ailleurs, l'état réticulé dont il est question pour ces peptides collagéniques
20 appartenant à la *troisième sous famille* décrite dans le présent exposé, est réversible. En effet, il est possible de réduire les ponts disulfure à l'aide d'agents réducteurs appropriés. Des exemples de ces réducteurs sont donnés ci-dessus.

Conformément à l'invention les restes carboxyliques libres des monomères acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique sont mobilisés pour le
25 greffage de fonctionnalités de réticulation. Mais il n'en reste pas moins qu'au moins une partie des autres fonctions libres de la chaîne collagénique, comme par exemple les fonctions amine des résidus lysine, peuvent servir de sites d'ancrage, pour des groupements qui diffèrent des restes mercaptoaminés tels que définis ci-dessus et qui procurent des fonctionnalités diverses et variées, utiles dans les applications visées.
30 D'où il s'ensuit que les peptides collagéniques tels que définis supra peuvent comporter, selon une variante, des greffons G fixés sur au moins une partie des motifs amine libres de la chaîne collagénique, par l'intermédiaire de liaisons amides, G étant un acyle comprenant une entité hydrocarbonée, A L'EXCLUSION des restes mercaptoaminés, notamment ceux tels que définis supra, cette entité comprenant,
35 éventuellement, des hétéroatomes (avantageusement O et/ou N) et étant, de préférence, choisie parmi les alkyles et/ou les alcényles et/ou les alicycliques et/ou les aromatiques et, plus préférentiellement encore, parmi les groupements comprenant

une chaîne alkyle, éventuellement insaturée, comprenant de 1 à 22 carbone(s) ou répondant à la formule (III) suivante :



avec :

- $\text{R}^5 = \text{H}$ ou CH_3 ;
- $\text{R}^6 = \text{H}$, un radical alkyle linéaire ou ramifié et de préférence un méthyle ;
- $z = 0, 1$ ou 2 et $n > 0$.

Le nombre n d'unités récurrentes est choisi de telle sorte que le poids moléculaire de la chaîne polymère soit compris entre 100 et 15 000, de préférence entre 200 et 8 000 et, par exemple, soit de l'ordre de 4 000.

Cette fonctionnalisation supplémentaire sur les sites amine des lysines peut conférer au peptide collagénique modifié un caractère hydrophile ou hydrophobe, voire tensioactif, ce qui permet de moduler les propriétés de gonflement, de résistance mécanique et de cinétique de dégradation. Il est également concevable que cette fonctionnalisation ait des visées thérapeutiques grâce à l'ancrage d'un principe actif.

Outre l'aspect produit collagénique pris en tant que tel, la présente invention a également trait à l'obtention de peptides collagéniques modifiés et, notamment, ceux tels que définis ci-dessus et, plus particulièrement encore, ceux appartenant aux *trois sous familles* présentées ci-avant.

L'invention concerne ainsi un procédé d'obtention d'un peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiols, libres ou substituées et portées par des restes mercaptoaminés. Ce procédé consiste essentiellement à faire réagir en solution le peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe des produits activant les groupements carboxyliques et, plus préférentiellement encore, parmi les carbodiimides.

Les conditions d'obtention sont choisies de telle sorte que le greffage du reste mercaptoaminé s'opère sur les motifs carboxyliques libres des acides aspartiques et glutamiques de la chaîne collagénique.

Ce procédé est particulièrement original et avantageux en ce qu'il peut être réalisé en milieu aqueux dans lequel sont au moins partiellement solubilisés les produits de départ et/ou les produits intermédiaires et/ou les collagènes modifiés finaux.

En pratique, tous les produits contenus dans le milieu réactionnel aqueux sont solubilisés dans celui-ci, de la première à la dernière étape.

Cette synthèse en milieu aqueux, conformément à l'invention, est particulièrement intéressante sur le plan industriel, car elle est très simple à mettre en œuvre, peu coûteuse et non polluante. En effet, il est aisé, par exemple, d'éliminer les réactifs (e. g. par diafiltration) et de récupérer le collagène modifié visé.

Le procédé selon l'invention est d'autant plus intéressant qu'il permet d'atteindre de forts taux de greffage de restes mercaptoaminés (e. g. 12 %).

De préférence, les restes mercaptoaminés (groupements monovalents) qui sont greffés sur le peptide collagénique, sont ceux tels que définis supra, notamment par les formules (I), (I.1), (I.2) et (I.3).

En pratique, les peptides collagéniques ainsi obtenus correspondent, e. g. aux précurseurs, tels que visés ci-dessus, de peptides collagéniques réticulables.

Ces précurseurs sont compris dans la *première sous-famille* de peptides collagéniques modifiés selon l'invention.

Pour pouvoir réagir avec les motifs carboxyliques libres du peptide collagénique, le greffon mercaptoaminé possède une fonction amine libre apte à réagir avec les COOH pour former une liaison amide. Ce précurseur est, par exemple, une cystéine, une homocystéine ou une cystéamine dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction acide carboxylique est (sont) correctement protégée(s). Un moyen efficace de protection de la fonction thiol est de choisir comme précurseur du reste mercaptoaminé à greffer, la cystine, l'homocystine ou la cystamine, qui comprennent un pont disulfure stabilisateur de la fonction mercapto. Comme autre moyen de protection de cette dernière, on peut choisir toute fonction classique de protection des thiols connue dans l'art antérieur (voir, par exemple, "Greene : *Protecting Groups in Organic Chemistry*, WILEY, 1975").

Les éventuelles fonctions COOH du greffon peuvent quant à elles être protégées à l'aide d'un groupement protecteur ou toute autre fonction organique pouvant apporter une propriété quelconque intéressante (les PEG, groupements hydrophobes ou hydrophiles ou chargés).

Selon une disposition avantageuse de l'invention, le précurseur du reste mercaptoaminé répond à une formule (IV) correspondant à la formule (I) donnée supra et dans laquelle la valence libre est remplacée par un substituant apte à réagir avec les fonctions carboxyliques des acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique, ce substituant étant de préférence l'hydrogène, de façon à ce que la fonction réactive soit une amine primaire. Les précurseurs de formule (IV) tout spécialement préférés sont la cystamine (I.1), la cystine-diméthylester (I.2) et la

cystine diéthylester (I.3), qui comprennent toutes trois un pont disulfure protégeant la fonction thiol.

En pratique, le greffage du reste mercaptoaminé s'effectue en procédant à la dissolution du peptide collagénique, puis du précurseur du reste mercaptoaminé à greffer dans un solvant approprié. Il peut s'agir, par exemple, de l'eau (de préférence)
5 et/ou d'un solvant organique, comme le DiMéthylSulfOxyde (DMSO), la N-MéthylPyrrolidone (NMP) ou autres.

Les conditions réactionnelles sont choisies afin d'éviter que le collagène activé ne réagisse avec les amines contenues dans son propre squelette.

10 La solution réactionnelle est ensuite additionnée d'un agent de couplage, tel qu'un carbodiimide, et on laisse le greffage s'opérer en maintenant le milieu sous agitation pendant quelques heures, à température ambiante.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des peptides collagéniques substitués par des restes mercaptoaminés précurseurs des restes thiols réticulables.

15 Les peptides ainsi obtenus sont de nouveaux produits intermédiaires stables et solubles dans l'eau. Ils peuvent être isolés et purifiés, par exemple par dialyse, diafiltration puis lyophilisation ou par précipitation en milieu organique puis par séchage.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation
20 d'un peptide collagénique réticulable modifié par greffage de fonctions thiol libres portées par des restes mercaptoaminés. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

1. à faire réagir en solution le peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et
25 l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence les carbodiimides,
2. et à déprotéger (transformation en thiols) les fonctions mercapto des
30 restes mercaptoaminés greffés sur les peptides collagéniques modifiés obtenus à l'étape 1.

Les peptides collagéniques réticulables ainsi préparés correspondent, par exemple, aux produits à fonctions thiol libres compris dans la *deuxième sous-famille* de peptides collagéniques modifiés, tels que définis supra.

35 Dans le cas où la protection ou le masquage des fonctions mercapto est assuré par un pont disulfure (c'est-à-dire quand les précurseurs des greffons sont e.g. la cystamine ou la cystine) la régénération de la fonction thiol se fait par réduction. Cette

dernière peut être réalisée à l'aide d'agents réducteurs tels que des mercaptans (mercaptoéthanol, acide mercaptoacétique, mercaptoéthylamine, benzylmercaptan, thiolcrésol, dithiothréitol,) et/ou des sels réducteurs (NaBH_4 , Na_2SO_3 ,.....) et/ou des réducteurs organiques (phosphine).

5 Suivant une caractéristique préférée de la présente invention, on procède à une réduction du pont disulfure de protection en milieu aqueux basique à l'aide de dithiothréitol. Après cette étape, le collagène thiolé obtenu est purifié par dialyse/diafiltration et peut être isolé e.g. par lyophilisation.

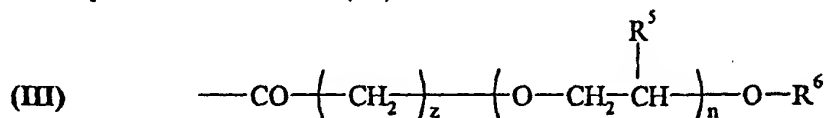
10 L'invention concerne, également, un procédé de préparation d'un peptide collagénique réticulé, à partir d'un peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiol libres et portées par des restes mercaptoaminés. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

- 15 1. à faire réagir en solution le peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence les carbodiimides,
- 20 2. et à déprotéger (transformation en thiols) les fonctions mercapto des restes mercaptoaminés greffés sur les peptides collagéniques modifiés obtenus à l'étape 1,
3. et à oxyder les fonctions thiol du peptide collagénique modifié réticulable issu de l'étape 2., de façon à former des ponts disulfure intercaténaires.

25 Cette oxydation peut être e. g. effectuée à l'aide de l'oxygène de l'air en milieu faiblement basique, ou à l'aide d'eau oxygénée ou de dérivés iodés (iode, bétadine). Les peptides collagéniques réticulés, tels que préparés par le procédé ci-dessus, correspondent notamment aux produits réticulés de la *troisième sous-famille* de peptides collagéniques modifiés, tels que définis ci-avant.

30 Suivant une caractéristique avantageuse propre aux trois procédés décrits ci-dessus, on prévoit une étape complémentaire F de fonctionnalisation par des greffons G de nature différente de celle des greffons fixés aux fonctions carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques, cette étape F consistant essentiellement à procéder à une acylation d'au moins une partie des fonctions amines libres de la chaîne collagénique, de façon à fixer sur celles-ci des greffons G comprenant une entité hydrocarbonée, A L'EXCLUSION des restes mercaptoaminés, notamment ceux tels
35 que définis supra, cette entité comprenant éventuellement des hétéroatomes

(avantageusement O et/ou N) et étant, de préférence, choisie parmi les alkyles et/ou les alcényles et/ou les alicycliques et/ou les aromatiques et, plus préférentiellement encore, parmi les groupements comprenant une chaîne alkyle, éventuellement insaturée ou répondant à la formule (III) suivante :



avec :

- $\text{R}^5 = \text{H}$ ou CH_3 ;
- $\text{R}^6 = \text{H}$, un radical alkyle linéaire ou ramifié et de préférence un méthyle ;
- $z = 0, 1$ ou 2 et $n > 0$.

Pour pouvoir réagir par acylation avec les fonctions amine libres du résidu de la chaîne collagénique, les précurseurs des greffons G comportent, avantageusement, au moins une fonction acide carboxylique activable.

Il est préférable que cette acylation se déroule avant la réaction des fonctions carboxyliques libres de la chaîne collagénique avec le précurseur du greffon mercaptoaminé (I). Ceci étant précisé, il n'est pas à exclure que cette acylation intervienne également sur les peptides collagéniques thiolés issus de l'étape 1 et/ou sur les peptides collagéniques réticulés issus de l'étape 3. (e. g. directement sur un film réticulé, avec élimination des réactifs par simple lavage).

Les réactions d'acylation et de couplage de fonctions amine avec des sites carboxyliques appartenant à des protéines, sont connues de l'homme du métier dans le domaine de la biochimie des protéines. Pour plus de détails à cet égard, on se référera notamment aux ouvrages suivants :

- "*Techniques in protein chemistry*" R. L LUNDBLAD Chap. 10-14.
- "*Chemistry of protein conjugation and cross-linking*" S. S. WONG, Boca raton, CRC Press, 1993, Chap. 2.

Il est intéressant de noter que les réactifs utilisés pour les modifications chimiques opérées selon les procédés conformes à l'invention, sont soit transformables en produits non toxiques, soit facilement éliminables par des procédés non dégradants comme par exemple la dialyse.

Par ailleurs, l'invention offre la possibilité très appréciable de contrôle de la cinétique et du taux de réticulation du collagène.

Un autre avantage non négligeable de la présente invention est qu'elle permet de moduler les propriétés mécaniques et la biodégradation en contrôlant le nombre des résidus mercaptoaminés introduits par unité de masse du collagène.

Il est également intéressant de pouvoir fonctionnaliser les chaînes collagéniques réticulées ou non à l'aide de fonctions hydrophiles, par exemple.

Enfin, il est important de signaler que les produits selon l'invention sont stérilisables par les méthodes classiques de stérilisation de polymères biologiques.

5 On insistera pour terminer sur la très bonne solubilité en milieu aqueux des nouveaux peptides collagéniques non réticulés selon l'invention, qui ont pour caractéristique de posséder des fonctions de réticulation soufrées portées exclusivement par les carboxyles des acides aspartiques et des glutamiques.

10 Il s'ensuit que les produits réticulables selon l'invention trouvent des applications immédiates, d'une part, en médecine humaine et, d'autre part, dans le domaine de la biologie.

15 En médecine humaine, il peut s'agir d'implants, par exemple ophtalmologiques, de prothèses, (par exemple osseuses), de pansements sous forme de films ou de feutres, de tissus artificiels (épiderme, vaisseaux, ligaments, os), de systèmes de bioencapsulation (microsphères, microcapsules) permettant la libération contrôlée de principes actifs in vivo, de revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables ou bien, encore, de fils de suture. Les produits collagéniques réticulables selon l'invention peuvent également être utilisés en chirurgie, comme colles et/ou comme matériaux d'étanchéification (ciments).

20 En biologie, les matériaux suivant l'invention constituent d'excellents supports pour cultures cellulaires bidimensionnelles (films) et tridimensionnelles (feutres).

25 Le collagène réticulé selon l'invention peut être utilisé seul ou en mélange, par exemple, avec des polymères biologiques modifiés ou non ou des polymères synthétiques.

30 Pour chacune des applications biomédicales précitées, il est indispensable de disposer d'un collagène, réticulé, possédant des propriétés physicochimiques, mécaniques ou biologiques déterminées et spécifiques. Par conséquent, il est nécessaire de maîtriser parfaitement les modifications chimiques du collagène, de manière à pouvoir produire une large gamme de collagènes réticulables et répondre ainsi, de façon satisfaisante, à la plupart des contraintes apparaissant lors de l'élaboration du cahier des charges d'une application donnée. Il ressort de la description ci-dessus que l'invention répond parfaitement à cette nécessité.

35 D'autres avantages et variantes de la présente invention ressortent bien des exemples de mise en oeuvre donnés ci-après.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : SYNTHÈSE D'UN PEPTIDE COLLAGENIQUE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT
5 SUBSTITUÉS PAR LA CYSTEINE-ETHYLESTER (TAUX DE
 SUBSTITUTION REPRESENTANT 0,8 % MOLAIRES DES ACIDES
 AMINES).

1) *Etape I : couplage (obtention 1^{ère} sous-famille) :*

10 25 g d'atélocollagène (types I + III, extrait de peaux de veaux, 1,3 mmol de COOH/g)
 sont placés dans 2,5 l d'eau et la température du milieu est amenée à 50 °C sous
 agitation. La solution à 1 % p/v ainsi obtenue est filtrée sur 0,22 µm.

 Une fois la température abaissée à 30 °C, 46,5 g de cystine-diéthylester sont ajoutés et
 le pH est ajusté à 4,2. On ajoute alors 0,6 g de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-
15 éthylcarbodiimide HCl et on laisse la réaction se dérouler pendant 2 h à 30 °C sous
 agitation. Le milieu réactionnel est concentré à 5 % p/v et dialysé contre de l'eau pour
 éliminer l'excès de réactifs et les sous-produits de la réaction.

 Le produit obtenu est un intermédiaire stable de synthèse. Il s'agit d'un peptide
 collagénique (1^{ère} sous-famille) dont une fraction des acides aspartiques et
20 glutamiques sont substitués par de la cystine-diéthylester.

 Le taux de substitution est mesuré par un dosage par le NSTB (2-nitro-5-
 thiosulfobenzoate), réactif des ponts disulfure. Ce dosage est décrit dans :
 Thannhauser T. W. et al., Analysis of disulfide bonds in peptides and proteins.
 Methods in Enzymology. Jacoby W. B. and Griffith O. XL New-York : Academic
25 Press, 1987. Vol. 143, 115-119.

 [S-S] : 0,094 mmol/g de produit sec ; soit 0,87 % molaire d'acides aminés substitués.

 Le produit obtenu peut être isolé par lyophilisation ou être réduit pour conduire au
 collagène thiol correspondant.

30 2) *Etape II : réduction (obtention 2^{ème} sous-famille) :*

 Au peptide collagénique modifié en solution à 5 % p/v dans l'eau obtenu à l'étape I,
 on ajoute 7,6 g de glycine, 5,8 g de 1,4-dithiothréitol et qsp NaOH 4 N pour atteindre
 un pH de 9,0. Le milieu réactionnel est maintenu trois heures sous agitation à 35 °C.
 A ce stade, la solution est acidifiée à pH 2 par HCl 6 N, dialysée contre HCl 0,012 N
35 pour éliminer toute trace de réactifs et de sous-produits de réaction, puis filtrée sur
 0,22 µm. Le produit ainsi purifié est isolé par lyophilisation.

Le taux de substitution est mesuré par un dosage par l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB), réactif spécifique des fonctions thiol. Ce dosage est décrit dans : "Ellman G. L., Tissue sulphydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82, 70-77".

- 5 [SH] : 0,091 mmol / g de produit sec, soit 0,8 % molaire d'acides aminés substitués.
Toute la synthèse peut être réalisée aseptiquement de manière à obtenir *in fine* le produit sous forme d'un lyophilisat stérile.

10 **EXEMPLE 2 :** **SYNTHESE D'UN PEPTIDE COLLAGENIQUE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT SUBSTITUES PAR LA CYSTEINE-ETHYLESTER (TAUX DE SUBSTITUTION REPRESENTANT 3 % MOLAIRES DES ACIDES AMINES).**

- 15 On reproduit l'exemple 1, à la seule exception que la quantité d'agent de couplage est de 2,9 g.
[SH] : 0,347 mmol / g de produit sec, soit 3,3 % molaire d'acides aminés substitués.

20 **EXEMPLE 3 :** **SYNTHESE D'UN PEPTIDE COLLAGENIQUE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT SUBSTITUES PAR LA CYSTEINE-ETHYLESTER (TAUX DE SUBSTITUTION REPRESENTANT 7 % MOLAIRES DES ACIDES AMINES).**

- 25 On reproduit l'exemple 1, à la seule exception que la quantité d'agent de couplage est de 12 g.
[SH] : 0,706 mmol / g de produit sec, soit 7 % molaire d'acides aminés substitués.

30 **EXEMPLE 4 :** **SYNTHESE D'UNE GELATINE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT SUBSTITUES PAR LA CYSTEINE-ETHYLESTER (TAUX DE SUBSTITUTION REPRESENTANT 5 % MOLAIRES DES ACIDES AMINES).**

- 35 On reproduit l'exemple 1, en remplaçant l'atélocollagène par de la gélatine (gélatine extraite de peaux de porcs, 250 bloom, 1 mmol de COOH/g).
[SH] : 0,536 mmol/g de produit sec, soit 5,2 % molaire d'acides aminés substitués.

EXEMPLE 5 : **SYNTHESE D'UN PEPTIDE COLLAGENIQUE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT SUBSTITUES PAR LA CYSTEAMINE (TAUX DE SUBSTITUTION REPRESENTANT 3 % MOLAIRES DES ACIDES AMINES).**

5

On reproduit l'exemple 1, en remplaçant 46,5 g de cystine-diéthylester par 28,4 g de cystamine.

[SH] : 0,33 mmol/g de produit sec, soit 3,0 % molaire d'acides aminés substitués.

10 **EXEMPLE 6 :** **SYNTHESE D'UN PEPTIDE COLLAGENIQUE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES AMINES SONT ACETYLEES (GREFFON G) ET DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT SUBSTITUES PAR LA CYSTEINE-ETHYLESTER (TAUX DE SUBSTITUTION REPRESENTANT 5 % MOLAIRES DES ACIDES AMINES).**

15

25 g d'atélocollagène (types I + III, extrait de peaux de veaux, 1,0 mmol de COOH/g ; 0,33 mol de ϵ -NH₂/g) sont placés dans 0,5 l d'eau et la température du milieu est amenée à 50 °C sous agitation. La solution à 5 % p/v ainsi obtenue est filtrée sur 0,22 μ m.

20 Après refroidissement de la solution à 30 °C, on dissout 4,2 g de NaHCO₃ et qsp NaOH 4 N pour ajuster le pH à 8,5. On ajoute alors lentement et séquentiellement, pendant 30 minutes, 7,34 ml d'anhydride acétique, sous agitation à 30 °C, tout en maintenant le pH à 8,5 à l'aide de soude 4 N. On acidifie alors lentement la solution à pH 3 par de l'HCl 6 N et on dialyse contre de l'eau pour éliminer les réactifs en excès.

25 On dilue enfin le milieu à 1 % p/v par de l'eau et on continue la synthèse tel qu'indiqué dans l'exemple 1 (couplage de la cystine-diéthylester puis réduction).

[acétyl] par dosage d'acide acétique (kit Boehringer) après hydrolyse basique du produit : 0,30 mmol/g de produit sec, soit 2,9 % molaire d'acides aminés acétylés (acétylation presque totale des résidus lysine).

30 [SH] : 0,53 mmol/g de produit, soit 5,1 % molaire d'acides aminés substitués.

EXEMPLE 7 : **SYNTHESE D'UN PEPTIDE COLLAGENIQUE (2^{ème} SOUS-FAMILLE) DONT LES AMINES SONT SUBSTITUEES PAR DU PEG (GREFFON G) ET DONT LES ACIDES CARBOXYLIQUES SONT SUBSTITUES PAR LA CYSTEINE-ETHYLESTER (TAUX DE**
5 **SUBSTITUTION REPRESENTANT 5 % MOLAIRES DES ACIDES AMINES).**

10 g d'atélocollagène (types I + III, extrait de peaux de veaux, 1,3 mmol de COOH/g ; 0,33 mol de ϵ -NH₂/g) sont placés dans 0,5 l d'eau et la température du milieu est amenée à 50 °C sous agitation. La solution à 2 % p/v ainsi obtenue est filtrée sur 0,22 μ m.

Une fois la température abaissée à 30 °C, le pH est ajusté à 9,0 par NaOH 4 N. On ajoute alors 5 g de N-hydroxysuccinimidylester du méthoxypolyéthylèneglycol acide propionique (SPA-PEG) de PM 5 000 g/mol et on laisse la réaction se dérouler à 30 °C sous agitation pendant 30 min, tout en maintenant le pH à 9 par un ajout de NaOH 4 N. On ajoute à nouveau 5 g de SPA-PEG et on agite le milieu réactionnel pendant 30 min en maintenant le pH. Le milieu est ensuite dilué au 1/2 par de l'eau pour ramener la concentration du collagène à 1 % p/v.

18,5 g de cystine-diéthylester sont ajoutés et le pH est ajusté à 4,2. On ajoute alors 2,2 g de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide. HCl et on laisse la réaction se dérouler pendant 2 h à 30 °C sous agitation. Le milieu réactionnel est concentré à 5 % p/v et dialysé contre de l'eau pour éliminer l'excès de réactifs et les sous-produits de la réaction.

Au peptide collagénique modifié en solution à 5 % p/v dans l'eau, on ajoute 3,0 g de glycine, 2,3 g de 1,4-dithiothréitol et qsp NaOH 4 N pour atteindre un pH de 9,0. Le milieu réactionnel est maintenu trois heures sous agitation à 35 °C. A ce stade, la solution est acidifiée à pH 2 par HCl 6 N, dialysée contre HCl 0,012 N pour éliminer toute trace de réactifs et de sous-produits de réaction puis filtrée sur 0,22 μ m. Le produit ainsi purifié est isolé par lyophilisation.

Le lyophilisat est extrait par 2 l d'éthanol absolu, contracté par de l'acétone puis séché sous vide à 30 °C pendant 18 h.

L'absence de polyéthylèneglycol non greffé est contrôlée par chromatographie de perméation sur gel, détection réfractométrique.

[SH] : 0,247 mmol/g de produit sec, soit 4,5 % molaire de substitution des acides aminés.

[PEG] : substitution de 0,8 % molaire des acides aminés, taux recalculé d'après la quantité d'OH-proline dosée dans le produit modifié / produit non modifié.

EXEMPLE 8 : SOLUBILITE DES PEPTIDES COLLAGENIQUES MODIFIES.

250 mg du peptide collagénique sont placés dans 5 g d'eau ppi, et on agite en flacon
 5 fermé pendant 15 min à 40 °C. Les mesures de pH sont réalisées à 30 °C. Les
 ajustements de pH sont réalisés à l'aide de NaOH 1N. Quelques exemples de
 solubilité sont présentés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1 :

10

PEPTIDE COLLAGENIQUE OBTENU	ASPECT INITIAL	SOLUBILITE
Exemple 1	pH 2,1 solution limpide	pas de zone d'insolubilité pour un pH allant de 2,5 à 10
Exemple 3	pH 2,2 solution limpide	pas de zone d'insolubilité pour un pH allant de 2,5 à 10
Exemple 5	pH 1,9 solution limpide	pas de zone d'insolubilité pour un pH allant de 2,5 à 10
Exemple 7	pH 2,5 gel transparent	fluidification au fur et à mesure que l'on augmente le pH. Solution fluide à partir de pH 6

EXEMPLE 9 : RETICULATION DES PEPTIDES COLLAGENIQUES (2^{ème} SOUS-FAMILLE) PAR OXYDATION : FORMATION DE GELS (3^{ème} SOUS-FAMILLE).

15

Le procédé utilisé est le même quel que soit le peptide collagénique utilisé (exemples 1, 3, 7).

250 mg de lyophilisat sont placés dans 4,5 ml de tampon phosphate salin 10 mM pH 7,4 (PBS) et le mélange est agité en flacon fermé à 40°C pendant 15 minutes. Le
 20 pH est ajusté à $7,4 \pm 0,1$ à l'aide de NaOH 1 N, et la quantité de PBS nécessaire pour
 obtenir une concentration finale en peptide collagénique de 50 g/l est ajouté. Les
 échantillons sont placés à 37 °C. A 900 µl de la solution de peptide collagénique sont
 ajoutés 100 µl d'une solution de H₂O₂ 1 % dans du PBS préchauffé à 37 °C. Les
 indications du Tableau 2 montrent que la réticulation par oxydation (cinétique et
 25 taux), dans des conditions données, dépend du peptide collagénique modifié utilisé.

TABLEAU 2 :

PEPTIDE COLLAGENIQUE OBTENU	TEMPS DE PRISE DU GEL (37 °C)	DESCRIPTION DU GEL (37 °C)
Exemple 1	20 secondes	gel homogène transparent souple
Exemple 3	5-10 secondes	gel homogène turbide
Exemple 7	1 minutes 15 secondes	gel homogène transparent mou et collant

5 **EXEMPLE 10 : RETICULATION DES PEPTIDES COLLAGENIQUES PAR OXYDATION : FORMATION DE FILMS.**

Le procédé de préparation du film est identique quelque soit le peptide collagénique utilisé.

10 **Etape 1 :**

Une solution à 20g/l de peptide collagénique précurseur, est préparée par dissolution du lyophilisat dans de l'eau stérile. Dans cet exemple 2,0 g de lyophilisat sont dissous dans 98 g d'eau stérile. Le mélange est agité dans un récipient fermé à 40°C pendant 15 min, afin d'obtenir une dissolution complète. Le pH de la solution est ajusté à 6,5 avec de la soude 1N, à 25 °C. La solution est remise en agitation à 40 °C pendant 10 min.

Etape 2 :

20 La solution à 40 °C est filtrée sur membranes de porosité 0,45 µm, puis sur membranes de porosité 0,2 µm. La dernière filtration s'effectue au dessus des moules stériles (on peut utiliser des boîtes de Petri en polystyrène).

Etape 3 :

25 40,0 g de solution filtrée sont coulés dans deux moules de 12 × 12 cm². Les moules sont refermés.

Etape 4 :

30 On réalise la maturation de la solution, qui se traduit par une gélification physique, pendant 24 h à une température de 16 °C ± 1. Cette température est nécessairement inférieure à la température de transition gel/sol. La maturation est effectuée dans une enceinte à température régulée, les moules reposent sur une plaque horizontale.

Etape 5 :

- Après 24 h, les couvercles des moules sont retirés et l'évaporation des solutions gélifiées s'effectue sur 24 h, à la même température dans une enceinte confinée, en présence d'agents dessicants (typiquement des pastilles de soude). Au bout de 24 h,
- 5 les films obtenus sont secs, limpides et lisses.

Etape 6 :

- La réticulation des films secs est effectuée à 20 °C, en versant 30 g de solution de peroxyde d'hydrogène à 0,3 % dans une solution aqueuse décimolaire d'acétate d'ammonium.
- 10

Etape 7 :

- Le film réticulé est retiré et lavé successivement par 30 g de tampon phosphate pH 7,4 et 30 g d'eau.
- 15 Toutes les solutions utilisées sont stériles.

Etape 8 :

- Le film est ensuite laissé à sécher sous hotte à flux laminaire pendant 24 h. Le films séché obtenu contient un pourcentage d'eau résiduelle de 10 % environ.
- 20
- Les films obtenus sont stables à température ambiante. Ils restent stables et manipulables après 24 h dans l'eau ou dans un tampon phosphate.

EXEMPLE 11 : PROPRIETES MECANQUES EN TRACTION DES FILMS OBTENUS

25 SELON L'EXEMPLE 10.

- Les mesures de propriétés mécaniques de films sont effectuées à l'aide d'un appareil d'essais universel de type DY34 de la marque Adamel Lhomargy. Les films sont hydratés à température ambiante dans un tampon phosphate salin (PBS, pH = 7,4) pendant 2 h. Puis ils sont découpés en bandes de 4 mm sur 30 mm à l'aide d'un
- 30 emporte pièce très coupant. L'épaisseur est mesurée sur les échantillons hydratés.
- Les échantillons sont fixés sur un cadre carton qui aide à la mise en place dans les mâchoires. L'échantillon de film est maintenu hydraté. Le cadre est coupé juste avant l'essai de traction, qui se déroule à vitesse constante de 2 mm/min.
- 35 Le module à l'origine ainsi que la contrainte à la rupture sont calculés d'après les courbes de traction en utilisant les sections des éprouvettes hydratées.

Les propriétés en traction des films obtenus selon le procédé décrit à l'exemple 10 dépendent du peptide collagénique modifié utilisé, comme le montre le Tableau 3.

TABEAU 3 :

5

PEPTIDE COLLAGENIQUE OBTENU	EPAISSEUR SECHE (μM)	EPAISSEUR HUMIDE (μM)	FMAX (N)	ALLONGEMENT (%)	σ max (Mpa)	MODULE INITIAL (MPa)
Exemple 1	45	153	2,9	43	3,2	4,6
Exemple 2	45	94,5	3,1	28,5	8,1	21,6
Exemple 3	45	80	5,4	42,5	16,7	25,8

LEGENDE : Fmax = force maximale à la rupture
 σ max = contrainte maximale à la rupture

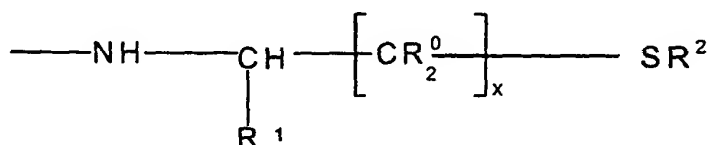
REVENDICATIONS :

1. Peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiol libres ou substitués, portées par des restes mercaptoaminés, caractérisé :

- en ce que ces restes mercaptoaminés sont identiques ou différents entre eux et sont exclusivement greffés sur les acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique par l'intermédiaire de liaisons amide,
- et en ce qu'il est soluble en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires .

2. Peptide collagénique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au moins une partie des restes mercaptoaminés, greffés sur les acides carboxyliques des acides aspartique et glutamique, répond à la formule générale (I) suivante :

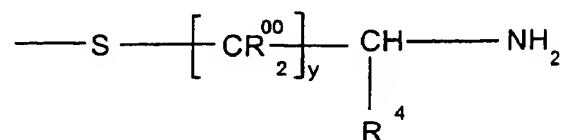
FORMULE (I)



dans laquelle :

- $x = 1$ ou 2 ;
- $R^0 = \text{H}$ ou CH_3 ;
- R^1 représente H ou COOR^3 avec R^3 correspondant à un radical hydrocarboné de type aliphatique, aromatique ou alicyclique, de préférence alkylique, alcénylique, arylique, aralkylique, alkylarylique, alcénylarylique; et plus préférentiellement encore de type méthylique ou éthylique;
- R^2 est un radical aliphatique et/ou alicyclique et/ou aromatique, de préférence un alkyle ou un acyle éventuellement soufré et/ou aminé, et plus préférentiellement encore R^2 répond à la formule (II) suivante:

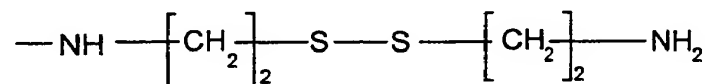
FORMULE (II)



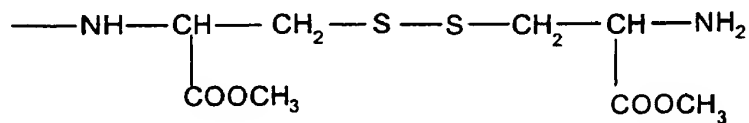
- avec y, R⁰⁰ et R⁴ répondant à la même définition que celle donnée en légende dans la formule (I) pour x, R⁰ et R¹.

3. Peptide collagénique selon la revendication 2 caractérisé en ce que les restes mercaptoaminés greffés sont choisis dans le groupe des radicaux suivants :

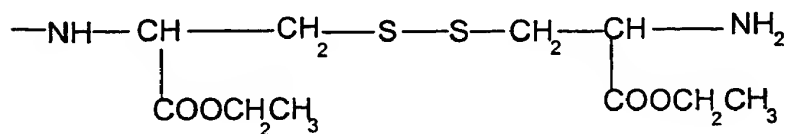
FORMULE (I.1)



FORMULE (I.2)



FORMULE (I.3)

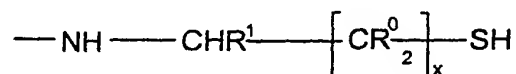


4. Peptide collagénique la revendication 2 , caractérisé

- ♦ en ce qu'il comprend des restes mercaptoaminés greffés de formule (I) telle que définie dans la revendication 2 et dans laquelle R^2 correspond à l'hydrogène.
- ♦ et en ce qu'il est réticulable .

5. Peptide collagénique selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend des restes mercaptoaminés de formule (I') suivante :

FORMULE (I')



dans laquelle R^1 correspond à H ou à COOR^3 , avec x, R^1 , R^0 , R^3 , tels que définis supra dans la revendication 2 en légende de la formule (I), R^3 pouvant, en outre, représenter l'hydrogène ou un cation apte à former un sel avec COO^- , ce cation étant, de préférence, Na^+ , K^+ , Li^+ .

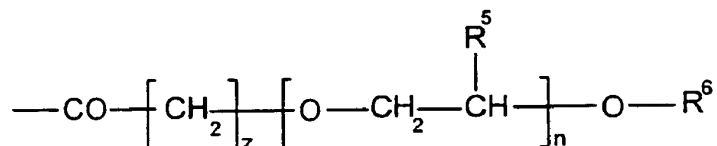
6. Peptide collagénique réticulé caractérisé

- en ce qu'il comprend des chaînes collagéniques reliées entre elles par des ponts disulfure dont les atomes de soufre constitutifs appartiennent à des restes mercaptoaminés exclusivement greffés, sur les acides aspartique et glutamique des chaînes collagéniques, par l'intermédiaire de liaisons amides
- en ce qu'il est obtenu à partir du peptide collagénique selon la revendication 4 et/ou 5.

7. Peptide collagénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comporte des greffons G fixés sur au moins une partie des motifs amine libres de la chaîne collagénique, par l'intermédiaire de liaisons amides, G étant un acyle comprenant une entité hydrocarbonée, A L'EXCLUSION des restes mercaptoaminés, notamment ceux tels que définis supra, cette entité comprenant, éventuellement, des hétéroatomes (avantageusement O et/ou N) et

étant, de préférence, choisie parmi les alkyles et/ou les alcényles et/ou les alicycliques et/ou les aromatique et, plus préférentiellement encore, parmi les groupements comprenant une chaîne alkyle, éventuellement insaturée, comprenant de 1 à 22 carbone(s) ou répondant à la formule (III) suivante :

FORMULE (III)



avec :

- $\text{R}^5 = \text{H}$ ou CH_3 ;
- $\text{R}^6 = \text{H}$, un radical alkyle linéaire ou ramifié et de préférence un méthyle ;
- $z = 0, 1$ ou 2 et $n > 0$.

8. Procédé d'obtention d'un peptide collagénique soluble en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires et modifié par greffage de fonctions thiol substituées et portées par des restes mercaptoaminés,

caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire réagir en solution le peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence les carbodiimides.

9. Procédé de préparation d'un peptide collagénique réticulable, modifié par greffage de fonctions thiol libres et portées des restes mercaptoaminés, caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

1. à faire réagir en solution le peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe

comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence carbodiimides;

2. et à déprotéger (transformation en thiols) les fonction mercapto des restes mercaptoaminés greffés sur les peptides collagéniques modifiés obtenus à l'étape 1.

10. Procédé de préparation d'un peptide collagénique réticulé à partir d'un peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiol libres et protégées par des restes mercaptoaminé, caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

1. à faire réagir en solution le peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence les carbodiimides,
2. et à déprotéger (transformation en thiols) les fonctions mercapto des restes mercaptoaminés greffés sur les peptides collagéniques modifiés obtenus à l'étape 1;
3. et à oxyder les fonctions thiol du peptide collagénique modifié réticulable issu de l'étape 2, de façon à former des ponts disulfure intercaténaires.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 caractérisé en ce que l'on prévoit une étape complémentaire F de fonctionnalisation par des greffons G de nature différente de celle des greffons fixés aux fonctions carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques, cette étape F consistant essentiellement à procéder à une acylation d'au moins une partie des fonctions amines libres de la chaîne collagénique A L'EXCLUSION des restes mercaptoaminés, notamment de ceux, tels que définis supra, cette entité comprenant, éventuellement, des hétéroatomes (avantageusement O et/ou N), et étant, de préférence, choisie parmi les alkyles et/ou les alcényles et/ou les alicyliques et/ou les aromatiques.

12. Application des peptides collagéniques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou du peptide obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, à titre de biomatériau constitutif d'implants, de prothèses, de pansements, de tissus artificiels, de système de bioencapsulation, de revêtement de biocompatibilisation, de fils de suture, de colles ou de ciments chirurgicaux ou de support pour culture cellulaire.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07K 14/78, 1/107, A61L 24/10, 27/24, 15/32	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/52052 (43) Date de publication internationale: 8 septembre 2000 (08.09.00)
---	-----------	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00513
(22) Date de dépôt international: 1er mars 2000 (01.03.00)

(30) Données relatives à la priorité:
99/02727 2 mars 1999 (02.03.99) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du Docteur G. Lévy, Parc Club du Moulin à Vent, F-69603 Vénissieux (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): NICOLAS, Florence [FR/FR]; 7, rue Maurice Genevoix, F-69740 Genas (FR). BRYSON, Nathan [US/FR]; 120, rue du Coteau, F-69390 Millery (FR).

(74) Mandataires: FLEURANCE, Raphael etc.; Cabinet Plasseraud, 27, rue de la Villette, F-69003 Lyon (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(54) Title: COLLAGEN PEPTIDES MODIFIED BY GRAFTING MERCAPTO FUNCTIONS, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND USES THEREOF AS BIOMATERIALS

(54) Titre: PEPTIDES COLLAGENIQUES MODIFIES PAR GREFFAGE DE FONCTIONS MERCAPTO, L'UN DE LEURS PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS COMME BIOMATERIAUX

(57) Abstract

The invention relates to novel collagen peptides that are modified by grafting free or substituted thiol functions carried by mercaptoamine radicals. The aim of the invention is to provide thiol collagens that can be cross-linked in a sufficient and controlled manner by forming S-S bridges and which are biocompatible. This is achieved by means of the inventive thiol collagens which are characterized in that the mercaptoamine radicals are identical to or different from each other and are exclusively grafted on the aspartic and glutamic acids of the collagen chain by amide bonds. The invention also relates to a method for the production of said thiol and cross-linkable collagens. The novel modified cross-linkable and/or cross-linked collagens can be used as biomaterials.

(57) Abrégé

L'invention concerne de nouveaux peptides collagéniques modifiés par greffage de fonctions thiol, libres ou substituées, portées par des restes mercaptoaminés. Le but visé par l'invention est de fournir des collagènes thiolisés, d'une part, aptes à réticuler de manière suffisante et contrôlée par formation de ponts S-S et, d'autre part, biocompatibles. Ce but est atteint par les collagènes thiolisés selon l'invention qui sont caractérisés en ce que ces restes mercaptoaminés sont identiques ou différents entre eux et sont exclusivement greffés sur les acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique par l'intermédiaire de liaisons amides. L'invention concerne, également, le procédé d'obtention de ces collagènes thiolisés et réticulables. Application de ces nouveaux collagènes modifiés sous forme réticulable et/ou réticulée comme biomatériau.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 00/00513

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/78 C07K1/107 A61L24/10 A61L27/24 A61L15/32

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 janvier 1999 (1999-01-13) page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; exemples 1-5	1-3,8
A	--- DATABASE CHEMABS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 abrégé; RN 60-23-1 * idem * & Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- -/--	1,4,5,9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 juillet 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Amsterdam, L

RAPPORT DE RECHE E INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/00513

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 le document en entier ----	1,4-6,8, 9
A	WO 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 mai 1990 (1990-05-31) cité dans la demande exemples ----	1,7,8, 11,12
A	FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 décembre 1993 (1993-12-24) cité dans la demande revendications 1-6, 19 -----	1,12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. : Internationale No

PCT/FR 00/00513

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 890663 A	13-01-1999	JP 11323727 A	26-11-1999
		CN 1207422 A	10-02-1999
WO 9005755 A	31-05-1990	US 5162430 A	10-11-1992
		AT 168708 T	15-08-1998
		AU 638687 B	08-07-1993
		AU 4660989 A	12-06-1990
		CA 2003538 A	21-05-1990
		DE 68928754 D	27-08-1998
		DE 68928754 T	14-01-1999
		EP 0444157 A	04-09-1991
		ES 2119743 T	16-10-1998
		JP 2505312 B	05-06-1996
		JP 4502027 T	09-04-1992
		US 5306500 A	26-04-1994
		US 5510418 A	23-04-1996
		US 5565519 A	15-10-1996
		US 5376375 A	27-12-1994
		US 5413791 A	09-05-1995
		US 5475052 A	12-12-1995
		US 5550187 A	27-08-1996
		US 5523348 A	04-06-1996
		US 5446091 A	29-08-1995
		US 5543441 A	06-08-1996
		US 5470911 A	28-11-1995
		US 5476666 A	19-12-1995
		US 5510121 A	23-04-1996
		US 5527856 A	18-06-1996
		US 5614587 A	25-03-1997
		US 5550188 A	27-08-1996
		US 5643464 A	01-07-1997
		US 5936035 A	10-08-1999
		US 5800541 A	01-09-1998
		US 5786421 A	28-07-1998
		US 5744545 A	28-04-1998
		US 5324775 A	28-06-1994
		US 5328955 A	12-07-1994
		US 5264214 A	23-11-1993
		US 5308889 A	03-05-1994
		US 5292802 A	08-03-1994
		US 5304595 A	19-04-1994
FR 2692582 A	24-12-1993	AT 160798 T	15-12-1997
		DE 69315483 D	15-01-1998
		DE 69315483 T	02-07-1998
		EP 0575273 A	22-12-1993
		ES 2113511 T	01-05-1998
		JP 6080935 A	22-03-1994
		US 5412076 A	02-05-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/78 C07K1/107 A61L24/10 A61L27/24 A61L15/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 January 1999 (1999-01-13) page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; examples 1-5	1-3,8
A	--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 abstract; RN 60-23-1 * idem * & Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- -/--	1,4,5,9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2000

Date of mailing of the international search report

14/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Amsterdam, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/00513

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 the whole document ---	1,4-6,8, 9
A	WO 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 May 1990 (1990-05-31) cited in the application examples ---	1,7,8, 11,12
A	FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 December 1993 (1993-12-24) cited in the application claims 1-6, 19 -----	1,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 890663 A	13-01-1999	JP 11323727 A CN 1207422 A	26-11-1999 10-02-1999
WO 9005755 A	31-05-1990	US 5162430 A AT 168708 T AU 638687 B AU 4660989 A CA 2003538 A DE 68928754 D DE 68928754 T EP 0444157 A ES 2119743 T JP 2505312 B JP 4502027 T US 5306500 A US 5510418 A US 5565519 A US 5376375 A US 5413791 A US 5475052 A US 5550187 A US 5523348 A US 5446091 A US 5543441 A US 5470911 A US 5476666 A US 5510121 A US 5527856 A US 5614587 A US 5550188 A US 5643464 A US 5936035 A US 5800541 A US 5786421 A US 5744545 A US 5324775 A US 5328955 A US 5264214 A US 5308889 A US 5292802 A US 5304595 A	10-11-1992 15-08-1998 08-07-1993 12-06-1990 21-05-1990 27-08-1998 14-01-1999 04-09-1991 16-10-1998 05-06-1996 09-04-1992 26-04-1994 23-04-1996 15-10-1996 27-12-1994 09-05-1995 12-12-1995 27-08-1996 04-06-1996 29-08-1995 06-08-1996 28-11-1995 19-12-1995 23-04-1996 18-06-1996 25-03-1997 27-08-1996 01-07-1997 10-08-1999 01-09-1998 28-07-1998 28-04-1998 28-06-1994 12-07-1994 23-11-1993 03-05-1994 08-03-1994 19-04-1994
FR 2692582 A	24-12-1993	AT 160798 T DE 69315483 D DE 69315483 T EP 0575273 A ES 2113511 T JP 6080935 A US 5412076 A	15-12-1997 15-01-1998 02-07-1998 22-12-1993 01-05-1998 22-03-1994 02-05-1995

PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION****International Bureau****INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)**

(51) International patent classification⁷: C07K 14/78, 1/107, A61L 24/10, 27/24, 15/32	A1	(11) International publication number: WO 00/52052 (43) International publication date: 8 September 2000 (08.09.00)
(21) International application number: PCT/FR00/00513 (22) International filing date: 1 March 2000 (01.03.00) (30) Data relating to the priority: 99/02,727 2 March 1999 (02.03.99) FR (71) Applicant (for all designated States except US): FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du Docteur G. Lévy, Parc Club du Moulin à Vent, F-69603 Vénissieux (FR). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): NICOLAS, Florence [FR/FR]; 7, rue Maurice Genevoix, F-69740 Genas (FR). BRYSON, Nathan [US/FR]; 120, rue du Coteau, F-69390 Millery (FR). (74) Representative: FLEURANCE, Raphael etc.; Cabinet Plasseraud, 27, rue de la Villette, F-69003 Lyon (FR).		(81) Designated states: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published With the International Search Report. Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.
As printed		
(54) Title: COLLAGEN PEPTIDES MODIFIED BY GRAFTING MERCAPTO FUNCTIONS, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND USES THEREOF AS BIOMATERIALS		
(54) Titre: PEPTIDES COLLAGENIQUES MODIFIES PAR GREFFAGE DE FONCTIONS MERCAPTO, L'UN DE LEURS PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS COMME BIOMATERIAUX		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to novel collagen peptides that are modified by grafting free or substituted thiol functions carried by mercaptoamine radicals. The aim of the invention is to provide thiol collagens that can be cross-linked in a sufficient and controlled manner by forming S-S bridges and which are biocompatible. This is achieved by means of the inventive thiol collagens which are characterized in that the mercaptoamine radicals are identical to or different from each other and are exclusively grafted on the aspartic and glutamic acids of the collagen chain by amide bonds. The invention also relates to a method for the production of said thiol and cross-linkable collagens. The novel modified cross-linkable and/or cross-linked collagens can be used as biomaterials.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention concerne de nouveaux peptides collagéniques modifiés par greffage de fonctions thiol, libres ou substituées, portées par des restes mercaptoaminés. Le but visé par l'invention est de fournir des collagènes thiolisés, d'une part, aptes à réticuler de manière suffisante et contrôlée par formation de ponts S-S et, d'autre part, biocompatibles. Ce but est atteint par les collagènes thiolisés selon l'invention qui sont caractérisés en ce que ces restes mercaptoaminés sont identiques ou différents entre eux et sont exclusivement greffés sur les acides aspartique et glutamique de la chaîne collagénique par l'intermédiaire de liaisons amides. L'invention concerne, également, le procédé d'obtention de ces collagènes thiolisés et réticulables. Application de ces nouveaux collagènes modifiés sous forme réticulable et/ou réticulée comme biomatériau.</p>		



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FLAMEL0056	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00513	International filing date (day/month/year) 01 March 2000 (01.03.00)	Priority date (day/month/year) 02 March 1999 (02.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/78, 1/107, A61L 24/10, 27/24, 15/32 -		
Applicant FLAMEL TECHNOLOGIES		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 18 September 2000 (18.09.00)	Date of completion of this report 23 May 2001 (23.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00513

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-23, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-3, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 4-12, filed with the letter of 26 February 2001 (26.02.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00513

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1: FR-A-2 692 582 (cited in the application, page 3, line 13).

1. Claims 1 to 5:

- 1.1 Document **D1**, which is considered the prior art closest to the subject matter of Claim 1, discloses (the references in parentheses apply to this document) a modified collagen that is useful as a biomaterial for prostheses, implants or other medical items, is soluble in water and/or in polar organic solvents, and contains free or substituted thiol functions carried by residues of cysteine or derivatives thereof bonded to the collagen (abstract). Said residues are grafted onto carboxylic residues added to the collagen, as well as onto the carboxyls of glutamic and aspartic amino acids, present in the starting collagen (page 9, lines 8-10, page 12, lines 28-33, page 13, lines 14-18, page 17, line 22). The residues are grafted by means of amide bonds (steps c and d of the example, page 20, lines 16-34: typical conditions for forming an amide bond).

The subject matter of Claim 1 therefore differs from said known modified collagenic peptide in that said mercapto-amino radicals are grafted **exclusively** onto the Asp and Glu acids of the collagenic chain.

The subject matter of **Claim 1**, as well as that of dependent Claims **2 to 5**, is therefore **novel** (PCT Article 33(2)).

In light of **D1**, the **problem** addressed by the present invention can be considered that of finding another modified collagenic peptide having biomaterial properties.

The **solution** proposed in **Claim 1** of the present application is considered **inventive**, since the claimed collagen molecule is simplified relative to that of **D1** (which must further comprise mercapto-amino radicals grafted onto the carboxylic residues added to the collagen).

The subject matter of **Claim 1**, as well as that of dependent Claims **2 to 5**, is therefore **inventive** (PCT Article 33(3)).

2. Claim 6:

Document **D1**, which is considered the prior art closest to the subject matter of Claim 6, discloses (the references in parentheses apply to this document) a cross-linked collagen characterized in that the bridges between the chains thereof consist of disulfide bridges resulting from cysteine residues bonded to the collagen via spacer compounds

(Claim 5). The spacer compounds in question enable at least one portion of the cysteine residues to be indirectly grafted onto the collagenic amino acids with alcohol or free amine functions (page 9, lines 6-10, page 16, lines 22-28 and page 17, lines 13-17).

The subject matter of Claim 6 therefore differs from said known modified collagenic peptide in that said mercapto-amino radicals are grafted **exclusively** onto the Asp and Glu acids of the original collagenic chain.

The subject matter of **Claim 6** is therefore **novel** (PCT Article 33(2)).

In light of **D1**, the **problem** addressed by the present invention can be considered that of finding another crosslinked collagenic peptide having biomaterial properties.

The **solution** proposed in **Claim 6** of the present application is considered **inventive** (PCT Article 33(3)), since the claimed collagen molecule is simplified relative to that of **D1** (which must further comprise mercapto-amino-radicals grafted onto the carboxyl residues added to the collagen).

3. Claim 7:

Claim 7 is dependent on Claims 1 or 6, which are novel and inventive. For this reason, the subject matter of **Claim 7** can be considered **novel** (PCT Article 33(2)) and **inventive** (PCT Article 33(3)).

4. Claims 8 to 11:

- 4.1 The method of Claim 8 comprises reacting only the carboxylic functions of the aspartic and glutamic acids of a collagen in order to obtain a portion of the novel and inventive collagenic peptides of Claim 1 (those having substituted thiol functions).

Since the method for obtaining a novel and inventive compound is considered novel and inventive, the subject matter of **Claim 8** meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

- 4.2 The method of Claim 9 comprises adding a deprotection step to the novel and inventive method of Claim 8. This method enables a portion of the novel and inventive collagenic peptides of Claim 1 to be obtained (those having free thiol functions).

Since the method for obtaining a novel and inventive compound is considered novel and inventive, the subject matter of **Claim 9** meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

- 4.3 The method of Claim 10 comprises adding an oxidation step to the novel and inventive method of Claim 9. This method enables the novel and inventive collagenic peptides of Claim 6 to be obtained.

Since the method for obtaining a novel and inventive compound is considered novel and inventive, the subject matter of **Claim 10** meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

4.4 The method of **Claim 11** is dependent on the novel and inventive methods of Claims 8 to 10, and, as such, is considered **novel** and **inventive** and meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

5.. Claim 12:

The use of of a novel and inventive compound is considered **novel** and **inventive**.

The subject matter of **Claim 12** meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

6. Industrial applicability:

The collagenic peptides defined in Claims 1 to 7 can be used as a biomaterial (Claim 12). The methods of Claims 8 to 11 can be used to produce collagenic peptides that are useful as biomaterials (Claim 12). The subject matter of **Claims 1-12** meets the **industrial applicability** requirement of PCT Article 33(4).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The publisher and publication year of the study mentioned in the description (page 14, line 24) have not been indicated.
2. The applicant's attention is drawn to the following typographical errors in the French text:
page 12, line 33: "focntions"
page 22, line 18: "Le films"
Claim 1: "substitués, portées" Claim 9: "thiol libres et portées des restes".

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire RF	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00513	Date du dépôt international (jour/mois/année) 01/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 02/03/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K14/78		
Déposant FLAMEL TECHNOLOGIES et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 3 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 18/09/2000	Date d'achèvement du présent rapport 23.05.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Jenn, T N° de téléphone +49 89 2399 7348 

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00513

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-23 version initiale

Revendications, N°:

1-3 version initiale

4-12 reçue(s) avec télécopie du 26/02/2001

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00513

- ☐ des revendications, n^{os} :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications Aucune
Activité inventive	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications Aucune
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications Aucune

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'Article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence au document suivant:

D1: FR-A-2 692 582 (cité dans la demande, page 3, ligne 13),

1. Revendications 1 à 5:

1.1 Le document **D1**, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 montre (les références entre parenthèses s'appliquent à ce document) un collagène modifié utile comme biomatériau pour prothèses, implants ou autres articles médicaux, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires, et contenant des fonctions thiol libres ou substituées portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés fixés au collagène (résumé). Ces résidus sont greffés sur des résidus carboxyliques introduits sur le collagène ainsi que sur les carboxyles des acides aminés glutamique et aspartique présent sur le collagène de départ (page 9, lignes 8-10, page 12, lignes 28-33, page 13, lignes 14-18, page 17, ligne 22). Les résidus sont greffés par l'intermédiaire de liaisons amides (étapes c et d de l'exemple, page 20, lignes 16-34: conditions typiques de formation d'une liaison amide).

L'objet de la revendication 1 diffère donc de ce peptide collagénique modifié connu en ce que les-dits restes mercaptoaminés sont **exclusivement** greffés sur les acides Asp et Glu de la chaîne collagénique.

L'objet de la **revendication 1**, ainsi que celui de ses revendications dépendantes **2 à 5**, est donc **nouveau** (Article 33(2) PCT).

Au vu de **D1**, le **problème** que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant de trouver un autre peptide collagénique modifié ayant des propriétés en tant que biomatériau.

La **solution** proposée dans la **revendication 1** de la présente demande est considérée comme **inventive** car la molécule de collagène revendiquée est simplifiée par rapport à celle de **D1** (qui doit comporter en outre des restes mercaptoaminés greffés sur des résidus carboxyliques introduits sur le collagène).

L'objet de la **revendication 1**, ainsi que celui de ses revendications dépendantes **2** à **5**, est donc **inventif** (Article 33(3) PCT).

2. Revendication 6:

Le document **D1**, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 6 montre (les références entre parenthèses s'appliquent à ce document) un collagène réticulé caractérisé en ce que ses pontages intercaténaux sont constitués par des ponts disulfures formés par des résidus cystéiques fixés au collagène par l'intermédiaire de composés d'espacement (revendication 5). Les composés d'espacement en question permettent le greffage indirect d'au moins une partie des résidus cystéiques sur les acides aminés collagéniques à fonctions alcool ou amine libre (page 9, lignes 6-10, page 16, lignes 22-28 et page 17, lignes 13-17).

L'objet de la revendication 6 diffère donc de ce peptide collagénique modifié connu en ce que les-dits restes mercaptoaminés sont **exclusivement** greffés sur les acides Asp et Glu de la chaîne collagénique d'origine.

L'objet de la **revendication 6** est donc **nouveau** (article 33(2) PCT).

Au vu de **D1**, le **problème** que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant de trouver un autre peptide collagénique réticulé ayant des propriétés en tant que biomatériau.

La **solution** proposée dans la **revendication 6** de la présente demande est considérée comme **inventive** (Article 33(3) PCT) car la molécule de collagène revendiquée est simplifiée par rapport à celle de **D1** (qui doit comporter en outre des restes mercaptoaminés greffés sur des résidus carboxyliques introduits sur le collagène).

3. Revendication 7:

La revendication 7 dépend des revendications 1 ou 6 qui sont neuves et inventives, c'est pourquoi l'objet de la **revendication 7** peut être considéré **nouveau** (Article 33(2) PCT) et **inventif** (Article 33(3) PCT).

4. Revendications 8 à 11:

4.1 Le procédé de la revendication 8 consiste à faire réagir exclusivement les fonctions carboxyliques des acides aspartique et glutamique d'un collagène afin d'obtenir une partie des peptides collagéniques nouveaux et inventifs de la revendication 1 (ceux ayant des fonctions thiol substituées).

Le procédé d'obtention d'un composé nouveau et inventif étant considéré nouveau et inventif, l'objet de la **revendication 8** remplit les conditions des Articles 33(2) et 33(3) PCT.

4.2 Le procédé de la revendication 9 consiste à ajouter une étape de déprotection au procédé nouveau et inventif de la revendication 8. Ce procédé permet d'obtenir une partie des peptides collagéniques nouveaux et inventifs de la revendication 1 (ceux ayant des fonctions thiol libres).

Le procédé d'obtention d'un composé nouveau et inventif étant considéré nouveau et inventif, l'objet de la **revendication 9** remplit les conditions des Articles 33(2) et 33(3) PCT.

4.3 Le procédé de la revendication 10 consiste à ajouter une étape d'oxydation au procédé nouveau et inventif de la revendication 9. Ce procédé permet d'obtenir les peptides collagéniques nouveaux et inventifs de la revendication 6.

Le procédé d'obtention d'un composé nouveau et inventif étant considéré nouveau et inventif, l'objet de la **revendication 10** remplit les conditions des Articles 33(2) et 33(3) PCT.

4.4 Le procédé de la **revendication 11** dépend des procédés nouveaux et inventifs des revendications 8 à 10, et en tant que tel, ce procédé est considéré **nouveau et inventif** et remplit les conditions des Articles 33(2) et 33(3) PCT.

5. Revendication 12:

L'application d'un composé nouveau et inventif est considérée **nouvelle et inventive**.

L'objet de la **revendication 12** remplit les conditions des Articles 33(2) et 33(3) PCT.

6. Application Industrielle:

Les peptides collagéniques définis dans les revendications 1 à 7 ont une application en tant que biomatériau (revendication 12); les procédés des revendications 8 à 11 ont une application pour former des peptides collagéniques utiles en tant que biomatériaux (revendication 12).

L'objet des **revendications 1-12** est conforme au critère d'**application industrielle** défini dans l'Article 33(4) PCT.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. L'éditeur et l'année de parution de l'ouvrage mentionné dans la description (page 14, ligne 24) ne sont pas indiqués.
2. L'attention de la Demanderesse est portée sur les erreurs de frappe suivantes:
 - page 12, ligne 33: "focntions",
 - page 22, ligne 18: "Le films",
 - revendication 1: "substitués, portées",
 - revendication 9: "thiol libres et portées des restes".

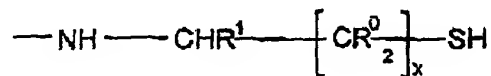
4. Peptide collagénique selon la revendication 2, caractérisé :

- ♦ en ce qu'il comprend des restes mercaptoaminés greffés de formule (I) telle que définie dans la revendication 2 et dans laquelle R^2 correspond à l'hydrogène
- ♦ et en ce qu'il est réticulable.

5

5. Peptide collagénique selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend des restes mercaptoaminés de formule (I') suivante :

FORMULE (I')



10

dans laquelle R^1 correspond à H ou à $COOR^3$, avec x, R^1 , R^0 , R^3 , tels que définis supra dans la revendication 2 en légende de la formule (I), R^3 pouvant, en outre, représenter l'hydrogène ou un cation apte à former un sel avec COO^- , ce cation étant, de préférence, Na^+ , K^+ , Li^+ .

15

6. Peptide collagénique réticulé caractérisé :

- en ce qu'il comprend des chaînes collagéniques reliées entre elles par des ponts disulfure dont les atomes de soufre constitutifs appartiennent à des restes mercaptoaminés exclusivement greffés, sur les acides aspartique et glutamique des chaînes collagéniques, par l'intermédiaire de liaisons amides
- en ce qu'il est obtenu à partir du peptide collagénique selon la revendication 4 et/ou 5.

20

25 7. Peptide collagénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comporte des greffons G, différents des restes mercaptoaminés, (notamment ceux tels que définis supra dans les revendications 1 à 6), fixés sur au moins une partie des motifs amine libres de la chaîne collagénique, par l'intermédiaire de liaisons amides, G étant un acyle comprenant une entité hydrocarbonée, comportant, éventuellement, des hétéroatomes (avantageusement O et/ou N) et étant, de préférence, choisie parmi les alkyles et/ou les alcényles et/ou les alicycliques et/ou les aromatiques et, plus préférentiellement encore, parmi les groupements comprenant une chaîne alkyle, éventuellement insaturée, comprenant de 1 à 22 carbone(s) ou répondant à la formule (III) suivante :

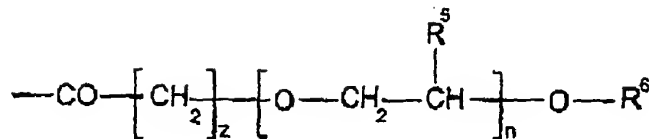
30

FEUILLE MODIFIEE

Nouvellement d'oposé



FORMULE (III)



avec :

- $\text{R}^5 = \text{H}$ ou CH_3 ;
- $\text{R}^6 = \text{H}$, un radical alkyle linéaire ou ramifié et de préférence un méthyle;
- $z = 0, 1$ ou 2 et $n > 0$ et n est choisi de telle sorte que le poids moléculaire de la chaîne polymère soit compris entre 100 et 15 000, de préférence entre 200 et 8 000.

8. Procédé d'obtention d'un peptide collagénique soluble en milieu aqueux et/ou dans les solvants polaires et modifié par greffage de fonctions thiol substituées et portées par des restes mercaptoaminés,

caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire réagir en solution, exclusivement les fonctions carboxyliques des acides aspartique et glutamique d'un peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence les carbodiimides.

9. Procédé de préparation d'un peptide collagénique réticulable, modifié par greffage de fonctions thiol libres et portées des restes mercaptoaminés, caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

1. à faire réagir en solution, exclusivement les fonctions carboxyliques des acides aspartique et glutamique d'un peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence carbodiimides ;

FEUILLE MODIFIEE

2. et à déprotéger (transformation en thiols) les fonction mercapto des restes mercaptoaminés greffés sur les peptides collagéniques modifiés obtenus à l'étape 1.
- 5 10. Procédé de préparation d'un peptide collagénique réticulé à partir d'un peptide collagénique modifié par greffage de fonctions thiol libres et portées par des restes mercaptoaminé, caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :
- 10 1. à faire réagir en solution, exclusivement les fonctions carboxyliques des acides aspartique et glutamique d'un peptide collagénique avec au moins un précurseur d'un reste mercaptoaminé dont la fonction thiol et l'éventuelle fonction carboxylique sont bloquées, en présence d'au moins un agent de greffage, de préférence choisi dans le groupe comprenant les produits activant les groupements carboxyliques, de préférence les carbodiimides ;
- 15 2. et à déprotéger (transformation en thiols) les fonctions mercapto des restes mercaptoaminés greffés sur les peptides collagéniques modifiés obtenus à l'étape 1 ;
3. et à oxyder les fonctions thiol du peptide collagénique modifié réticulable issu de l'étape 2, de façon à former des ponts disulfure intercaténares.
- 20 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 caractérisé en ce que l'on prévoit une étape complémentaire F de fonctionnalisation par des greffons G de nature différente de celle des greffons fixés aux fonctions carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques, cette étape F consistant essentiellement à procéder à une acylation d'au moins une partie des fonctions amines libres de la chaîne collagénique, de façon à fixer sur celles-ci des greffons G comprenant
- 25 une entité hydrocarbonée, cette entité comprenant, éventuellement, des hétéroatomes (avantageusement O et/ou N), et étant, de préférence, choisie parmi les alkyles et/ou les alcényles et/ou les alicyliques et/ou les aromatiques.
- 30 12. Application des peptides collagéniques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou du peptide obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, à titre de biomatériau constitutif d'implants, de prothèses, de pansements, de tissus artificiels, de système de bioencapsulation, de revêtement de biocompatibilisation, de fils de suture, de colles ou de ciments chirurgicaux ou de support pour culture cellulaire.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/00513

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/78 C07K1/107 A61L24/10 A61L27/24 A61L15/32

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EP0-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 janvier 1999 (1999-01-13) page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; exemples 1-5	1-3,8
A	--- DATABASE CHEMABS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 abrégé; RN 60-23-1 * idem * & Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- -/--	1,4,5,9



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 juillet 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Amsterdam, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00513

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 890663	A	13-01-1999	JP 11323727 A	26-11-1999
			CN 1207422 A	10-02-1999
<hr/>				
WO 9005755	A	31-05-1990	US 5162430 A	10-11-1992
			AT 168708 T	15-08-1998
			AU 638687 B	08-07-1993
			AU 4660989 A	12-06-1990
			CA 2003538 A	21-05-1990
			DE 68928754 D	27-08-1998
			DE 68928754 T	14-01-1999
			EP 0444157 A	04-09-1991
			ES 2119743 T	16-10-1998
			JP 2505312 B	05-06-1996
			JP 4502027 T	09-04-1992
			US 5306500 A	26-04-1994
			US 5510418 A	23-04-1996
			US 5565519 A	15-10-1996
			US 5376375 A	27-12-1994
			US 5413791 A	09-05-1995
			US 5475052 A	12-12-1995
			US 5550187 A	27-08-1996
			US 5523348 A	04-06-1996
			US 5446091 A	29-08-1995
			US 5543441 A	06-08-1996
			US 5470911 A	28-11-1995
			US 5476666 A	19-12-1995
			US 5510121 A	23-04-1996
			US 5527856 A	18-06-1996
			US 5614587 A	25-03-1997
			US 5550188 A	27-08-1996
			US 5643464 A	01-07-1997
			US 5936035 A	10-08-1999
			US 5800541 A	01-09-1998
			US 5786421 A	28-07-1998
			US 5744545 A	28-04-1998
			US 5324775 A	28-06-1994
			US 5328955 A	12-07-1994
			US 5264214 A	23-11-1993
			US 5308889 A	03-05-1994
			US 5292802 A	08-03-1994
			US 5304595 A	19-04-1994
<hr/>				
FR 2692582	A	24-12-1993	AT 160798 T	15-12-1997
			DE 69315483 D	15-01-1998
			DE 69315483 T	02-07-1998
			EP 0575273 A	22-12-1993
			ES 2113511 T	01-05-1998
			JP 6080935 A	22-03-1994
			US 5412076 A	02-05-1995
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00513

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 le document en entier ----	1,4-6,8, 9
A	WO 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 mai 1990 (1990-05-31) cité dans la demande exemples ----	1,7,8, 11,12
A	FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 décembre 1993 (1993-12-24) cité dans la demande revendications 1-6, 19 -----	1,12

REQUETE PCT

FLAMEL0056

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

0 0-1	Réservé à l'office récepteur Demande internationale No.	PCT-FR 00/00513
0-2	Date du dépôt international	
0-3	Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	
0-4 0-4-1	Formulaire - PCT/RO/101 Requête PCT Préparé avec	PCT-EASY Version 2.90 (mis à jour 15.12.1999)
0-5	Pétition Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets	
0-6	Office récepteur (choisi par le déposant)	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)
0-7	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	FLAMEL0056
I	Titre de l'invention	PEPTIDES COLLAGENIQUES MODIFIES PAR GREFFAGE DE FONCTIONS MERCAPTO, L'UN DE LEURS PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS COMME BIOMATERIAUX.
II II-1 II-2 II-4 II-5	Déposant Cette personne est : Déposant pour Nom Adresse:	Déposant seulement Tous les Etats désignés sauf US FLAMEL TECHNOLOGIES 33, avenue du Docteur G. Lévy Parc club du moulin à vent F-F-69603 VENISSIEUX France
II-6 II-7 II-8 II-9 II-10	Nationalité (nom de l'Etat) Résidence (nom de l'Etat) No. de téléphone No de télécopieur: Courrier électronique:	FR FR 04.72.78.34.00 04.72.78.34.31 ysac@flamel.com
III-1 III-1-1 III-1-2 III-1-4 III-1-5	Déposant et/ou inventeur Cette personne est : Déposant pour Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom) Adresse:	Déposant et inventeur US seulement NICOLAS, Florence 7, rue Maurice Genevoix F-69740 GENAS France
III-1-6 III-1-7	Nationalité (nom de l'Etat) Résidence (nom de l'Etat)	FR FR

REQUETE PCT

FLAMEL0056

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

III-2	Déposant et/ou inventeur	Déposant et inventeur
III-2-1	Cette personne est :	US seulement
III-2-2	Déposant pour	BRYSON, Nathan
III-2-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	120 , rue du coteau
III-2-5	Adresse:	F-69390 MILLERY
		France
III-2-6	Nationalité (nom de l'Etat)	US
III-2-7	Résidence (nom de l'Etat)	FR
IV-1	Mandataire ; Représentant commun ou adresse pour la correspondance. La personne nommée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme	mandataire
IV-1-1	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	FLEURANCE, Raphael
IV-1-2	Adresse:	CABINET PLASSERAUD Le Danica B 21 , avenue G.POMPIDOU F-69486 cedex 03 LYON France
IV-1-3	No. de téléphone	04.72.91.30.23
IV-1-4	No de télécopieur:	04.72.91.30.53
IV-1-5	Courrier électronique:	fleurance@plass.com
IV-2	Mandataire(s) supplémentaire(s)	mandataire
IV-2-1	Nom	CABINET PLASSERAUD
IV-2-2	Adresse:	84, rue d'Amsterdam F-75440 cedex 09 PARIS France
IV-2-3	No. de téléphone	01.44.63.41.11
IV-2-4	No de télécopieur:	01.42.80.01.59
IV-2-5	Courrier électronique:	boulinguiez@plass.com

REQUETE PCT

FLAMEL0056

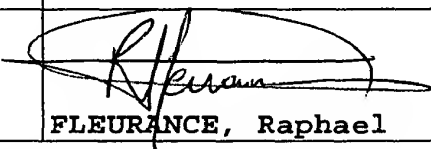
Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

V	Désignation d'Etats	
V-1	Brevet régional (d'autres formes de protection ou de traitement, le cas échéant, sont spécifiées entre parenthèses pour les Etats désignés concernés)	<p>AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurásien et du PCT</p> <p>EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT</p>
V-2	Brevet national (d'autres formes de protection ou de traitement, le cas échéant, sont spécifiées entre parenthèses pour les Etats désignés concernés)	<p>AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW</p>
V-5	Déclaration concernant les désignations de précaution Outre les désignations faites sous les rubriques V-1, V-2 et V-3, le déposant fait aussi, conformément à la règle 4.9.b), toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation(s) indiquée(s) dans la rubrique V-6 ci-dessous. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité sera considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai.	
V-6	Exclusion(s) des désignations de précaution	NEANT
VI-1	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-1-1	Date du dépôt	02 mars 1999 (02.03.1999)
VI-1-2	Numéro	9902727
VI-1-3	Pays	FR

REQUETE PCT

FLAMEL0056

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

VI-2	Requête pour le document de priorité L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures mentionnées ci-dessus sous la/les rubriques:	VI - 1	
VII-1	Administration chargée de la recherche internationale choisie	Office européen des brevets (OEB) (ISA/EP)	
VII-2	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche		
VII-2-1	Date	02 mars 1999 (02.03.1999)	
VII-2-2	Numéro	FR 99 02727	
VII-2-3	Pays (ou office régional)	EP	
VIII	Bordereau	Nombre de feuilles	Dossier(s) électronique(s) joint(s)
VIII-1	Requête	5	-
VIII-2	Description	23	-
VIII-3	Revendications	5	-
VIII-4	Abrégé	1	0056-bqt-abrege-fichier_txt.txt
VIII-5	Dessins	0	-
VIII-7	TOTAL	34	
	Eléments joints	Document(s) papier joint(s)	Dossier(s) électronique(s) joint(s)
VIII-8	Feuille de calcul des taxes	✓	-
VIII-16	Disquette PCT-EASY	-	disquette
VIII-18	Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé		
VIII-19	Langue de dépôt de la demande internationale	français	
IX-1	Signature du déposant ou du mandataire		
IX-1-1	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	FLEURANCE, Raphael L 422-5/065 PG 8535	

RESERVE A L'OFFICE RECEPTEUR

10-1	Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale	1 MARS 2000
10-2	Dessins:	
10-2-1	Reçus	
10-2-2	non reçus	
10-3	Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale:	

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

10-4	Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT	
10-5	Administration chargée de la recherche internationale	ISA/EP
10-6	Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche	

RESERVE AU BUREAU INTERNATIONAL

11-1	Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international	
------	--	--

PCT (ANNEXE - FEUILLE DE CALCUL DES TAXES)

FLAMEL0056

Original (pour PRÉSENTATION) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

(Cette feuille ne fait pas partie de la demande internationale ni ne compte comme une feuille de celle-ci)

0	Réservé à l'office récepteur		
0-1	Demande internationale No.	PCT-FR 00/00513	
0-2	Timbre à date de l'office récepteur	1 MARS 2000	
0-4	Formulaire - PCT/RO/101 (Annexe)		
0-4-1	Feuille de calcul des taxes PCT Préparé avec	PCT-EASY Version 2.90 (mis à jour 15.12.1999)	
0-9	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	FLAMEL0056	
2	Déposant	FLAMEL TECHNOLOGIES, et al.	
12	Calcul des taxes prescrites	Montant total des taxes/multiplicateur	Montant total (FRF)
12-1	Taxe de transmission T	⇒	400
12-2	Taxe de recherche S	⇒	6 198.79
12-3	Taxe internationale Taxe de base (30 premières feuilles) b1	2 709.1	
12-4	Feuilles suivantes	4	
12-5	Montant additionnel (X)	65.6	
12-6	Montant total additionnel b2	262.4	
12-7	b1 + b2 = B	2 971.5	
12-8	Taxes de désignation Nombre de désignations indiquées dans la demande internationale	83	
12-9	Number of designation fees payable (maximum 8)	8	
12-10	Montant de la taxe de désignation (X)	623.16	
12-11	Montant total des taxes de désignation D	4 985.28	
12-12	Réduction de taxe PCT-EASY R	- 833.07	
12-13	Montant total de la taxe internationale (B+D-R) I	⇒	7 123.71
12-14	Taxe afférente au document de priorité Numéros des documents de priorité à préparer et à transmettre:	1	
12-15	Taxe par document (X)	100	
12-16	Montant total de la taxe afférente au document de priorité P	⇒	100
12-17	TOTAL DES TAXES DUES (T+S+I+P)	⇒	13 822.5
12-19	Mode de paiement	chèque	
12-20	Instructions concernant le compte de dépôt L'office récepteur:	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)	

PCT (ANNEXE - FEUILLE DE CALCUL DES TAXES)

 Original (pour **PRESENTATION**) - imprimé le 01.03.2000 11:06:11 AM

12-20-2	est autorisé à débiter mon compte de dépôt de tout montant manquant, ou à le créditer de tout excédent, dans le paiement du total des taxes indiqué ci-dessus	✓
12-20-3	est autorisé à débiter mon compte de dépôt de la taxe afférente à la préparation et à la transmission du document de priorité au Bureau international	✓
12-21	Compte de dépôt No.	3001
12-22	Date	01 mars 2000 (01.03.2000)
12-23	Nom et signature	FLEURANCE, Raphael

MESSAGES DE VALIDATION ET REMARQUES

13-2-1	Messages de validation Requête	Vert? Le titre de l'invention doit être bref et précis. Prière de vérifier.
13-2-6	Messages de validation Bordereau	Jaune! Le pouvoir ou une copie du pouvoir général devra être fourni à moins que tous les déposants signent la requête.
		Vert? La demande internationale ne contient pas de dessins. Prière de vérifier.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/78 C07K1/107 A61L24/10 A61L27/24 A61L15/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 January 1999 (1999-01-13) page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; examples 1-5	1-3,8
A	--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 abstract; RN 60-23-1 * idem * & Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- -/--	1,4,5,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2000

Date of mailing of the international search report

14/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Amsterdam, L

PROJET DE LOI
RELATIF A LA
CONSTRUCTION D'UN
BARRAGE

PROJET DE LOI
RELATIF A LA
CONSTRUCTION D'UN
BARRAGE

PROJET DE LOI

PROJET DE LOI
RELATIF A LA
CONSTRUCTION D'UN
BARRAGE

PROJET DE LOI
RELATIF A LA
CONSTRUCTION D'UN
BARRAGE

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00513

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 the whole document ----	1,4-6,8, 9
A	WO 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 May 1990 (1990-05-31) cited in the application examples ----	1,7,8, 11,12
A	FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 December 1993 (1993-12-24) cited in the application claims 1-6, 19 -----	1,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 890663 A	13-01-1999	JP 11323727 A CN 1207422 A	26-11-1999 10-02-1999
WO 9005755 A	31-05-1990	US 5162430 A AT 168708 T AU 638687 B AU 4660989 A CA 2003538 A DE 68928754 D DE 68928754 T EP 0444157 A ES 2119743 T JP 2505312 B JP 4502027 T US 5306500 A US 5510418 A US 5565519 A US 5376375 A US 5413791 A US 5475052 A US 5550187 A US 5523348 A US 5446091 A US 5543441 A US 5470911 A US 5476666 A US 5510121 A US 5527856 A US 5614587 A US 5550188 A US 5643464 A US 5936035 A US 5800541 A US 5786421 A US 5744545 A US 5324775 A US 5328955 A US 5264214 A US 5308889 A US 5292802 A US 5304595 A	10-11-1992 15-08-1998 08-07-1993 12-06-1990 21-05-1990 27-08-1998 14-01-1999 04-09-1991 16-10-1998 05-06-1996 09-04-1992 26-04-1994 23-04-1996 15-10-1996 27-12-1994 09-05-1995 12-12-1995 27-08-1996 04-06-1996 29-08-1995 06-08-1996 28-11-1995 19-12-1995 23-04-1996 18-06-1996 25-03-1997 27-08-1996 01-07-1997 10-08-1999 01-09-1998 28-07-1998 28-04-1998 28-06-1994 12-07-1994 23-11-1993 03-05-1994 08-03-1994 19-04-1994
FR 2692582 A	24-12-1993	AT 160798 T DE 69315483 D DE 69315483 T EP 0575273 A ES 2113511 T JP 6080935 A US 5412076 A	15-12-1997 15-01-1998 02-07-1998 22-12-1993 01-05-1998 22-03-1994 02-05-1995

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 570872
FR 9902727

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP 0 890 663 A (KANEKA CO) 13 janvier 1999 (1999-01-13) * page 4, ligne 43 - page 5, ligne 43; exemples 1-5 *	1-3
A	* idem *	9
X	--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US STN, CAPLUS accession no. 1979:422431, XP002125733 * abrégé; RN 60-23-1 *	1,4,5
A	* idem *	10
A	& Y. CHONAN ET AL: HIKAKU KAGAKU, vol. 24, no. 3, 1978, pages 140-147, --- C. LIN ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1038, no. 3, 1990, pages 382-385, XP000864311 * le document en entier *	1,4-6,9, 10
A,D	W0 90 05755 A (COLLAGEN CORP) 31 mai 1990 (1990-05-31) * exemples *	1,8,9, 12,13
A,D	--- FR 2 692 582 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 24 décembre 1993 (1993-12-24) * revendications 1-6, 19 *	1,13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 décembre 1999		Van Amsterdam, L
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

THE UNITED STATES OF AMERICA
 DEPARTMENT OF THE INTERIOR
 BUREAU OF LAND MANAGEMENT

SECTION 16		SECTION 17		SECTION 18		SECTION 19		SECTION 20	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
791	792	793	794	795	796	797	798	799	800
801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820
821	822	823	824	825	826	827	828	829	830
831	832	833	834	835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846	847	848	849	850
851	852	853	854	855	856	857	858	859	860
861	862	863	864	865	866	867	868	869	870
871	872	873	874	875	876	877	878	879	880
881	882	883	884	885	886	887	888	889	890
891	892	893	894	895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906	907	908	909	910
911	912	913	914	915	916	917	918	919	920
921	922	923	924	925	926	927	928	929	930
931	932	933	934	935	936	937	938	939	940
941	942	943	944	945	946	947	948	949	950
951	952	953	954	955	956	957	958	959	960
961	962	963	964	965	966	967	968	969	970
971	972	973	974	975	976	977	978	979	980
981	982	983	984	985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000

THIS DOCUMENT CONTAINS NEITHER RECOMMENDATIONS NOR
 CONCLUSIONS OF THE BUREAU OF LAND MANAGEMENT
 IT IS THE RESPONSIBILITY OF THE USER TO APPLY
 THE APPROPRIATE PROTECTION TO THE INFORMATION CONTAINED
 HEREIN

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 570872
FR 9902727

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

16-12-1999

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 890663 A	13-01-1999	CN 1207422 A	10-02-1999
WO 9005755 A	31-05-1990	US 5162430 A	10-11-1992
		AT 168708 T	15-08-1998
		AU 638687 B	08-07-1993
		AU 4660989 A	12-06-1990
		CA 2003538 A	21-05-1990
		DE 68928754 D	27-08-1998
		DE 68928754 T	14-01-1999
		EP 0444157 A	04-09-1991
		ES 2119743 T	16-10-1998
		JP 2505312 B	05-06-1996
		JP 4502027 T	09-04-1992
		US 5306500 A	26-04-1994
		US 5510418 A	23-04-1996
		US 5565519 A	15-10-1996
		US 5376375 A	27-12-1994
		US 5413791 A	09-05-1995
		US 5475052 A	12-12-1995
		US 5550187 A	27-08-1996
		US 5523348 A	04-06-1996
		US 5446091 A	29-08-1995
		US 5543441 A	06-08-1992
		US 5470911 A	28-11-1995
		US 5476666 A	19-12-1995
		US 5510121 A	23-04-1996
		US 5527856 A	18-06-1996
		US 5614587 A	25-03-1997
		US 5550188 A	27-08-1996
		US 5643464 A	01-07-1997
		US 5936035 A	10-08-1999
		US 5800541 A	01-09-1998
		US 5786421 A	28-07-1998
		US 5744545 A	28-04-1998
		US 5324775 A	28-06-1994
		US 5328955 A	12-07-1994
		US 5264214 A	23-11-1993
		US 5308889 A	03-05-1994
		US 5292802 A	08-03-1994
		US 5304595 A	19-04-1994
FR 2692582 A	24-12-1993	AT 160798 T	15-12-1997
		DE 69315483 D	15-01-1998
		DE 69315483 T	02-07-1998
		EP 0575273 A	22-12-1993
		ES 2113511 T	01-05-1998

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

FA 570872
FR 9902727

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets,
ni de l'Administration française

16-12-

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2692582 A		JP 6080935 A US 5412076 A	22-03-1994 02-05-1995

RECEIVED MARCH 20 1967

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° d publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 692 582

②1 N° d'enregistrement national : 92 07692

⑤1 Int Cl^s : C 08 H 1/00, A 61 L 27/00, 31/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.06.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 24.12.93 Bulletin 93/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société Anonyme: FLAMEL
TECHNOLOGIES — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Gagnieu Christian.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Nouveaux dérivés réticulables de collagène, leur procédé d'obtention et leur application à la préparation de biomatériaux.

⑤7 - La présente invention concerne un collagène modifié, réticulable, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, et contenant des fonctions thiols libres ou substituées portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, lesdits résidus étant au moins en partie fixés au collagène par l'intermédiaire de composés d'espacement.

- Elle a également pour objet un procédé d'obtention dudit collagène.

- Applications: biomatériaux pour prothèses, implants ou autres articles médicaux.

FR 2 692 582 - A1



**NOUVEAUX DERIVES RETICULABLES DE COLLAGENE, LEUR PROCEDE
D'OBTENTION ET LEUR APPLICATION A LA PREPARATION DE BIOMATERIAUX**

La présente invention est relative à de nouveaux dérivés réticulables de collagène susceptibles d'être utilisés dans la
05 préparation de biomatériaux, à partir desquels des produits applicables, notamment en médecine, et plus particulièrement en chirurgie, ou en cosmétologie, peuvent être obtenus.

Parmi ces produits, on peut citer les tissus ou les organes artificiels, tels que la peau artificielle, les prothèses
10 ou implants osseux, ligamentaires, cardio-vasculaires, intra-oculaires..., ou bien encore les systèmes de bioencapsulation (implants, microsphères, microcapsules) permettant la libération contrôlée de principes actifs in vivo.

A titre d'exemple, on peut également évoquer les
15 accessoires médicaux, tels que les fils de sutures ou les revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables.

Pour chacune des applications biomédicales précitées, il est indispensable d'obtenir pour le collagène réticulé certaines
20 propriétés physicochimiques, mécaniques ou biologiques de façons reproductibles et contrôlées. Seules la parfaite maîtrise des modifications chimiques du collagène, la large gamme des produits synthétisés selon l'invention et la bonne adaptabilité des procédés de réticulation qui en découlent permettent de répondre de façon
25 satisfaisante à la plupart des contraintes apparaissant lors de l'élaboration du cahier des charges d'une application donnée.

L'invention concerne, également, un procédé d'obtention de ces nouveaux dérivés réticulables de collagène, ainsi que de nouveaux produits intermédiaires intervenant dans le susdit
30 procédé, et enfin, le collagène réticulé issu du collagène réticulable considéré.

Le domaine de l'invention est celui des matériaux biocompatibles à base de collagène, utiles comme matière première pour la réalisation d'articles destinés à être mis en contact avec
35 ou implantés dans le corps humain ou animal, et capables de

s'assimiler au mieux aux matériaux biologiques, notamment sur le plan mécanique, de manière à pouvoir les remplacer. L'application visée est essentiellement la médecine humaine.

Le collagène est une protéine connue, présente à tous
05 les niveaux de l'organisation des tissus animaux : il s'agit de la principale protéine de la peau et du tissu conjonctif. Par nature, il possède des caractéristiques biochimiques et physico-chimiques relativement bien adaptées au milieu vivant.

Au sens de la présente invention, le terme collagène
10 désigne tout peptide de nature collagénique, dont notamment la gélatine.

Différentes qualités de collagène d'origine animale ou humaine sont actuellement commercialisées dans le monde, essentiellement pour l'élaboration de biomatériaux ou de produits
15 cosmétiques.

Dans les applications répandues à l'heure actuelle, on se satisfait des propriétés des différentes qualités disponibles.

Ainsi, parmi ces collagènes on trouve d'excellents supports d'adhésion, de multiplication et de croissance cellulaire, appréciés pour la réalisation de milieux de culture cellulaire.
20

On tire également profit de leur hydrophilie, de leur faible immunogénicité, de leur bonne résistance à la protéolyse et de leur caractère hémostatique.

Les propriétés mécaniques des collagènes natifs sont
25 acceptables pour un certain nombre d'utilisations.

Cependant, force est de reconnaître que dans le domaine des articles médicaux implantables, tels que les implants et les prothèses, les collagènes natifs du marché souffrent d'importantes lacunes quant à leur résistance mécanique et à leur résistance à
30 la protéolyse.

En effet, l'introduction de ces corps étrangers, que constituent les implants et les prothèses, dans un organisme vivant induit des phénomènes de rejet qui se traduisent, notamment, par des réactions inflammatoires provoquant, entre autre, la production
35 de collagénase, qui hydrolyse le collagène. Il en résulte, pour le

moins, une altération du comportement mécanique du greffon à base de collagène.

On sait que la réticulation permet d'améliorer les propriétés mécaniques du collagène. Elle confère aux fibres de collagène une très grande résistance à la traction et à la déchirure, grâce aux nombreuses liaisons covalentes qu'elle crée entre les chaînes de collagène.

Sur la base de cette connaissance scientifique, de nombreuses études ont été entreprises pour développer les possibilités de réticulation artificielle du collagène.

Il est ainsi apparu trois grands types de techniques de réticulation de cette protéine.

Le premier type de technique est la réticulation à l'aide d'agent pontant dans laquelle des molécules exogènes, le plus souvent bifonctionnelles, sont greffées pour permettre l'établissement des liaisons. Les réactifs les plus fréquemment employés sont :

- Les mono- et di-aldéhydes tels que le formaldéhyde (engendrant des ponts méthylènes), le malonaldéhyde et surtout le glutaraldéhyde (réticulant par liaisons imines et aldols). Les principaux problèmes sont dus à leurs extrémités -CHO qui sont irritantes et à l'autopolymérisation des di-aldéhydes qui les rend cytotoxiques.
- Les composés dicarboxyliques qui sont, à ce jour, essentiellement employés soit pour modifier le collagène, soit pour le tannage des peaux et qui agissent par liaisons amides voire esters.
- Les diamines, telles que l'hexaméthylène diamine, qui agissent uniquement par liaisons amides.
- Les diisocyanates, dont l'hexaméthylène diisocyanate qui est utilisé pour la réticulation par liaisons amides.
- Les disulfonyl-chlorures qui établissent des liaisons intra et inter-caténaires.

Suivant un second type de technique, on procède à la création d'un réseau par liaison covalente entre les molécules de collagène, et ce sans greffage de composés exogènes.

Les principales méthodes employées sont :

- 05 - L'irradiation (rayonnement ultra-violet ou gamma) qui produit à la fois un certain nombre de désaminations oxydatives, permettant des réticulations par liaisons imines et aldols, ainsi que des radicaux libres très réactifs pouvant créer des pontages covalents.
- 10 Une telle méthode présente l'inconvénient de provoquer la réticulation du collagène seulement dans une étroite zone, pour des basses énergies, tandis que pour des énergies supérieures, elle entraîne des hydrolyses ou des dénaturations très préjudiciables au produit.
- 15 - La déshydratation (poussée : plus de 100°C, sous vide) qui conduit à la formation de liaisons amides et esters, ainsi que de lysino-alanines intra et intermoléculaires. Parmi les réactifs employés, on peut citer les carbodiimides, tels que le cyanamide ou le dicyclohexylcarbodiimide. Ce mode de réticulation en est encore au stade expérimental.
- 20 - la réticulation enzymatique par des protéines mimant l'effet de la lysesyloxidase (enzyme responsable de la réticulation naturelle). Cela reste pour le moment à l'étude.
- 25 - L'oxydo-réduction qui induit une désamination oxydative des extrémités aminées qui deviennent aldéhydiques. On utilise essentiellement des cations métalliques (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+}) associés à des cofacteurs (Ascorbate, Pyridoxal-5P), ainsi que des sulfites ou des nitrites. Cette méthode est très utilisée pour le tannage du cuir.
- 30 - L'activation fonctionnelle, en particulier des carboxyles qui peuvent fournir des azides d'acides
- 35 ayant une réactivité très sélective vis-à-vis des

extrémités $-NH_2$ et conduisant à la formation d'une liaison amide. Divers biomatériaux peuvent être réalisés ainsi.

05 Le troisième type de technique est la réticulation par copolymérisation. Elle consiste à réunir, par des liaisons covalentes, le collagène à un autre polymère pour donner des conformations plus ou moins enchevêtrées. Les polymères les plus souvent associés au collagène sont :

- 10 - les dérivés d'acrylique, dont la toxicité est souvent rédhibitoire pour les applications en médecine humaine du type implant ;
- les mélanges acrylonitrile-styrène avec lesquels il n'a jusqu'alors pas été possible de dépasser le stade du laboratoire ;
- 15 - les polyuréthannes surtout utilisés dans le renforcement des cuirs tannés ;
- les polyalcools ;
- et les silicones.

20 Les liaisons impliquées dans la copolymérisation sont très diverses et dépendent des groupements mis en jeu par chaque polymère.

Toutes ces techniques, qu'elles soient de nature physique ou chimique, possèdent de nombreux inconvénients.

25 Tout d'abord, concernant les réticulations chimiques, elles donnent lieu à des résidus toxiques dans le collagène réticulé. Les résidus peuvent être sous forme de réactifs non consommés ou de fonctions réactives libres, issues de réactifs bifonctionnels qui n'ont réagi que par une seule extrémité.

30 S'agissant des réticulations physiques, elles sont toutes de mise en oeuvre délicate et manquent de reproductibilité.

De manière générale, ces deux types de réticulation entraînent une perte partielle ou totale de l'affinité des cellules tissulaires pour le collagène modifié.

35 En outre, elles ne peuvent pas être mises en oeuvre pour l'obtention d'articles moulés, à partir de solutions de collagène.

En effet, aucune d'elles ne permet de maîtriser la cinétique de réticulation, pas plus que le taux de réticulation.

Dans de telles conditions aléatoires, il n'est pas possible d'envisager des fabrications industrielles simples, économiques et conduisant à des produits de qualité mécanique adaptée aux applications visées.

C'est la raison pour laquelle, dans la grande majorité des cas, les techniques de réticulation ont été utilisées limitativement sur des pièces anatomiques ou des tissus contenant du collagène.

De façon plus exceptionnelle, elles ont été mises en oeuvre pour la réticulation d'articles préformés en collagène, essentiellement des films ou des feutres.

En tout état de cause, elles demeurent inopérantes dans le large domaine restant des applications à titre de biomatériaux.

Il a été proposé, par ailleurs, d'exploiter le pontage le plus couramment rencontré sur le plan biologique : la liaison disulfure -S-S-.

Il a ainsi été décrit dans l'article intitulé "Einbau von cystin-brücken in kollagen" - F. SCHADE & H. ZAHN - Angew, Chem 74, 904 (1962), la fixation directe, sans intermédiaire d'espacement, d'un dérivé de la cystine dans du collagène, pour tenter d'effectuer une réticulation par pontage S-S-.

Dans ce résumé succinct de leurs travaux, les auteurs prétendent avoir obtenu du collagène réticulé par des ponts disulfures.

L'agent réticulant mis en oeuvre est un dérivé de la cystine, dans lequel les deux fonctions amine de la cystine ont été bloquées par un groupement protecteur, du genre carbobenzoxyl.

Après greffage sur le collagène, les ponts disulfure ont été réduits puis réoxydés par l'oxygène de l'air (facteur d'auto-réticulation) en milieu basique.

Cet article enseigne le greffage direct de cystine sur du collagène, sans utilisation d'un composé d'espacement.

La technique de greffage direct employée permet des taux de substitution faibles égaux à 3 % en nombre maximum, ce qui correspond au taux de résidus lysyls dans le collagène.

05 Vingt ans après ce premier article, la demande de brevet européen n° 0 049 469 divulgue un pansement à base de collagène et de fibrinogène combinés. Dans ce document, on décrit l'introduction directe de fonctions thiols dans du collagène soluble extrait de tendons. Les fonctions thiols sont amenées par l'intermédiaire de la N-acétyl homocystéine thiolactone. De la
10 même manière que précédemment, le greffage de cette molécule sur le collagène ne peut intervenir que sur les radicaux aminés libres, portés par les résidus lysyl, ce qui équivaut à un taux de greffage maximal de 3 % en nombre, en supposant que la réaction soit totale.

15 Il faut enfin souligner l'absence de composé d'espacement reliant le collagène au résidu cystéique employé.

La présente invention vise à proposer un collagène modifié, réticulable, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, porteur de fonctions thiols libres
20 ou substituées appartenant à des résidus de cystéine ou de ses dérivés et apte à réticuler dans ces milieux, par formation de ponts disulfures, pour donner des gels en présence d'oxydants doux, en permettant une excellente maîtrise de la cinétique et du taux de réticulation.

25 Un autre but de l'invention est de fournir un collagène "thiolisé", réticulable en gels de densité de réticulation, donc de résistance mécanique, modulable à l'avance, de façon à être adaptable à toute application.

Un autre but de l'invention est de fournir un collagène,
30 modifié, réticulable dont la souplesse et les performances de réticulation le consacre comme une matière première particulièrement appropriée pour l'élaboration, par exemple par moulage ou extrusion, d'articles médicaux solides du type implants ou prothèses médicaux.

35 Aussi, c'est après avoir mené de nombreux essais et

études que la demanderesse est parvenue à surmonter les obstacles auxquels s'était heurté l'art antérieur et à atteindre ces buts et d'autres en fixant des résidus cystéiques sur le collagène, au moins en partie par l'intermédiaire de composés d'espacement.

05 Ainsi, la présente invention concerne un nouveau collagène modifié, réticulable, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, et contenant des fonctions thiols libres ou substituées, portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, lesdits résidus étant au moins en
10 partie, fixés au collagène par l'intermédiaire de composés d'espacement.

 De façon tout à fait avantageuse, le collagène modifié suivant l'invention est aisément façonnable et manipulable industriellement. Il permet d'obtenir des articles médicaux, du
15 type implant, prothèse ou peau artificielle, atoxiques, non immunogènes et dont les propriétés mécaniques et biologiques sont parfaitement adaptées à l'application visée.

 Au sens de la présente invention, le terme "réticulable" désigne indifféremment des collagènes modifiés aptes à
20 s'autoréticuler spontanément en présence de l'oxygène de l'air, à température ambiante, éventuellement en présence d'agents auxiliaires doux, tels que des oxydants ou des collagènes modifiés aptes à réticuler à l'aide d'agents auxiliaires n'intervenant pas directement dans la réaction et ne se retrouvant pas dans
25 le produit réticulé.

 L'excellente biocompatibilité de ce collagène modifié trouve, en partie, son origine dans le fait que les fonctions thiols libres ou substituées sont portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés (ci-après indifféremment désignés sous
30 le terme général : résidus "cystéiques"), à savoir par exemple la cystéine elle-même, la cystine et l'homocystéine.

 Conformément à l'invention, les résidus "cystéiques" sont en partie liés au collagène par l'intermédiaire de composés d'espacement. Chaque composé d'espacement comprend, de préférence,
35 plusieurs radicaux carboxyliques. Plus préférentiellement

encore, le composé d'espacement est un acide dicarboxylique apte à former un anhydride cyclique. On peut choisir ce composé dans la liste non limitative suivante d'acides dicarboxyliques ou de leurs dérivés : acide succinique, glutarique, phtalique, itaconique, maléique, l'acide succinique étant particulièrement préféré.

Ce composé d'espacement permet le greffage indirect d'au moins une partie des résidus "cystéiques" sur les acides aminés collagéniques à fonctions alcool ou amine libres. D'autres résidus "cystéiques" se fixent directement sur les acides aminés porteurs de groupements carboxyliques (acides glutamique et aspartique).

Le taux de substitution, par des fonctions thiols libres du collagène modifié suivant l'invention, peut varier dans une large plage de valeurs.

En particulier et de façon tout à fait originale, il peut être supérieur à 3 fonctions thiols pour cent acides aminés de la chaîne collagénique. Ceci est particulièrement intéressant au regard de l'adaptabilité, notamment sur le plan des propriétés mécaniques, du biomatériau à diverses applications finales.

Ce collagène modifié passe aisément à l'état réticulé par oxydation des fonctions thiols et création de ponts disulfures dans un environnement oxydant doux. Dans des conditions physiologiques, in vivo, cela peut se produire par autooxydation par l'oxygène dissous ou par oxydation enzymatique, alors que dans des conditions non physiologiques, in vitro, l'oxydation peut s'effectuer à l'aide de réactifs non toxiques, tels que le peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène de l'air, en milieu faiblement basique.

Le polymère réticulé peut être obtenu très stable et possédant une grande résistance au cisaillement.

L'invention concerne, également, à titre de produit nouveau, un collagène réticulé, insoluble notamment dans l'eau et/ou dans les solvants organiques, caractérisé en ce que le composé d'espacement est un produit de nature carboxylique, et de préférence, un acide dicarboxylique apte à former un anhydride cyclique.

Ce collagène réticulé peut être obtenu à partir du collagène modifié, autoréticulable évoqué ci-dessus.

La présente invention concerne, par ailleurs, un procédé d'obtention d'un collagène modifié, réticulable, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, et contenant des fonctions thiols libres.

Ce procédé comprend essentiellement les étapes successives suivantes :

- a - solubilisation du collagène de départ dans au moins un solvant organique polaire aprotique,
- b - acylation et carboxylation du collagène solubilisé,
- c - activation des fonctions carboxyles libres du collagène,
- d - réaction du collagène activé avec un résidu cystéique à fonction(s) thiols bloquées(s), de manière à obtenir un précurseur inerte du collagène modifié visé.

Suivant une première forme de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, il est prévu une étape supplémentaire e consistant en l'activation directe du précurseur inerte par formation de fonctions thiols libres ou substituées conduisant au collagène modifié réticulable visé. Cette activation peut notamment être réalisée par réduction.

Conformément à une deuxième forme de mise en oeuvre du procédé suivant l'invention, les étapes supplémentaires suivantes sont prévues :

- e₁ - activation indirecte du précurseur inerte, de préférence par oxydation, conduisant à du collagène réticulé par l'intermédiaire de ponts disulfure intercaténaires,
- f₁ - transformation, de préférence par réduction, du collagène réticulé en collagène modifié porteur de fonctions thiols libres ou substituées, stabilisées.

Les étapes a à d, e, e₁ et f₁ sont décrites en détail

ci-après.

Le matériau de départ utilisé dans ce procédé peut être du collagène animal ou humain, soluble dans les solvants organiques polaires aprotiques, et présentant ou non des télopeptides.

05 Il peut éventuellement s'agir d'un collagène modifié, par exemple, par acylation (e.g. succinylation) de ses fonctions aminées.

Il va de soi que le matériau de départ peut être constitué par un mélange d'au moins deux de ces différents types
10 de collagène.

L'étape a est l'une des étapes essentielles du procédé suivant l'invention, car elle permet la formation d'un milieu réactionnel organique, qui s'est avéré être particulièrement adapté et nécessaire aux opérations ultérieures.

15 Le collagène de départ est donc solubilisé dans un solvant organique polaire aprotique, tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylacétamide (DMAC), le diméthylformamide (DMF) ou le N-méthylpyrrolidone (NMP).

Cette solubilisation est, de préférence, effectuée à
20 l'aide d'un auxiliaire de solubilisation qui peut être un solvant, comme par exemple le méthanol ou un acide carboxylique correspondant, de préférence, à celui employé lors de l'étape b.

L'étape b est une étape d'acylation et de carboxylation du collagène solubilisé. Elle est, de préférence, effectuée à
25 l'aide d'un anhydride de diacide carboxylique. Cette réaction permet la fixation par liaison covalente de l'une des extrémités COOH du diacide sur une fonction OH ou NH₂ libre des acides aminés. En final, la chaîne peptidique est porteuse de groupements COOH libres, constitués chacun par l'autre extrémité carboxylée
30 du diacide.

La forme réactive devant se présenter sous forme d'anhydride, on choisit, en tant que diacide carboxylique, ceux qui sont aptes à former des anhydrides cycliques. Il s'agit, de préférence, de diacides comportant au moins 4 atomes de carbone.

35 A titre d'exemple, on peut citer la liste de composés

suivants : acide succinique, glutarique, phtalique, itaconique, citraconique et maléique. Naturellement, il convient d'étendre cette liste aux dérivés de tous types des susdits acides.

05 Les anhydrides d'acide succinique ou glutarique sont particulièrement préférés.

Avantageusement, l'anhydride est mis à réagir avec le collagène en solution, en présence d'une base organique, de préférence du type tertiaire, telle que la triéthylamine, ou bien encore la N-méthyl ou N-éthyl morpholine.

10 Après extraction et lavage, on récupère un collagène substitué par le diacide considéré, à un taux modulable en fonction de la proportion d'anhydride mis en présence du collagène et/ou de la quantité de base mise en oeuvre.

15 D'une manière générale, compte tenu du nombre de fonctions réactives disponibles sur le collagène, le taux de substitution peut varier d'environ 1 à environ 22 acides aminés acylés pour cent acides aminés du collagène. Ces collagènes acylés, par exemple succinylés, à un taux de substitution supérieur ou égal à environ 1, de préférence inférieur ou égal à 20 environ 22 radicaux acyles pour cent acides aminés, constituent de nouveaux produits intermédiaires stables.

Les collagènes substitués obtenus sont solubles dans l'eau à un pH supérieur à 5,5-7 et dans les solvants organiques polaires aprotiques, quel que soit l'anhydride utilisé.

25 A titre illustratif et non limitatif, on peut signaler que les collagènes substitués par de l'acide succinique sont solubles dans l'eau à un pH inférieur à 2,3 et supérieur à 5,5.

Après acylation/carboxylation, les collagènes présentent environ entre 10 et 30 % en nombre de résidus amino acides 30 porteurs d'une fonction carboxylique. Il s'agit, en premier lieu, de ceux qui ont réagi avec l'anhydride acide, et, en second lieu, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique présents dans le collagène de départ.

Le collagène acylé et carboxylé est soumis ensuite à 35 l'étape c d'activation de ses fonctions carboxyles libres. Celle-ci

est réalisée à l'aide d'un halogénure d'acide carboxylique, de préférence un chlorure d'acide, et conduit à la formation d'anhydrides mixtes sur toute fonction carboxyle libre du collagène acylé.

05 Le chlorure d'acide utilisé est généralement choisi dans la famille des alkyl et/ou aryl-chloro-carbonates et des chlorures d'acide carboxyliques encombrés.

On retiendra préférentiellement l'éthyl chloroformate, mais également le chlorure de triméthyl acétyle.

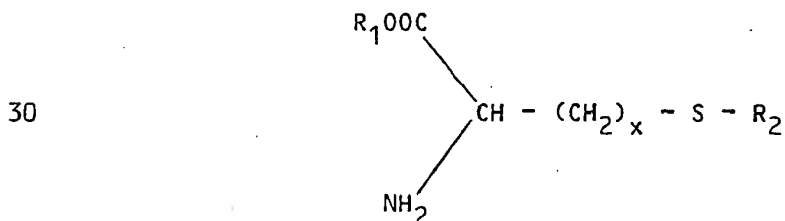
10 L'activation s'opère dans un milieu solvant aprotique polaire (DMSO, DMF, DMAC, NMP, seul ou en mélange), en présence d'une base organique tertiaire, telle que la triéthylamine ou la N-méthyl ou N-éthyl morpholine, de préférence, la triéthylamine.

15 Cette réaction d'activation intéresse aussi bien les résidus carboxyliques introduits dans l'étape b que les carboxyles des acides aminés glutamique et aspartique, soit au total pour un collagène fortement acylé, environ 30 % en nombre des acides aminés.

20 Le collagène acylé, par exemple succinylé et activé, par exemple à l'aide d'éthylchloroformate, constitue lui aussi un intermédiaire réactionnel nouveau.

L'étape d consiste à faire réagir le collagène activé avec un résidu "cystéique" à fonction(s) thiol(s) bloquée(s), de manière à obtenir un précurseur inerte du collagène modifié visé.

25 Par résidus "cystéiques" au sens de la présente invention, on entend tout composé de formule générale :

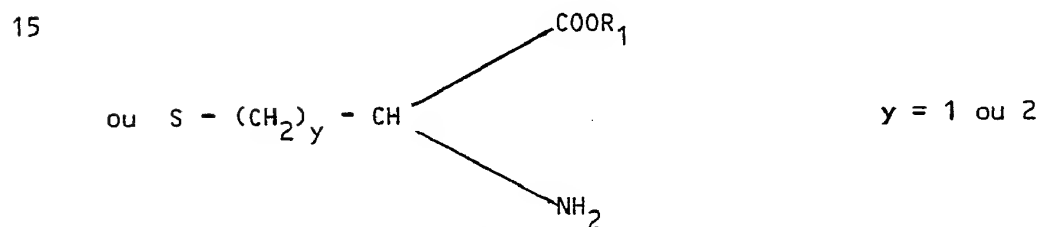
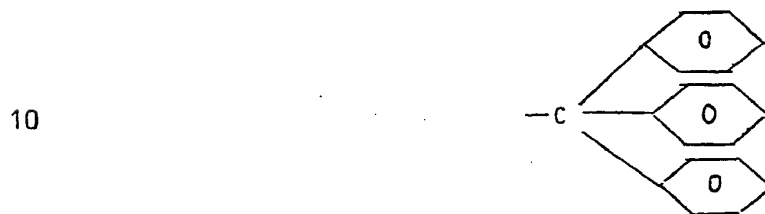


dans laquelle :

35 - R₁ est une chaîne carbonée aliphatique et/ou aromatique et/ou

cyclique, de préférence alkylique, alkylénique, arylique ou aralkylénique et plus préférentiellement encore, méthylique, éthylique, ou allylique ;

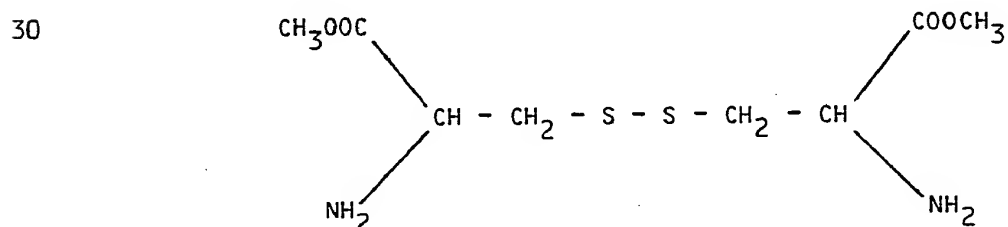
- 05 - R_2 est une chaîne carbonée éventuellement soufrée, aliphatique et/ou aromatique et/ou cyclique, de préférence choisie parmi les groupements de formule générale suivante :



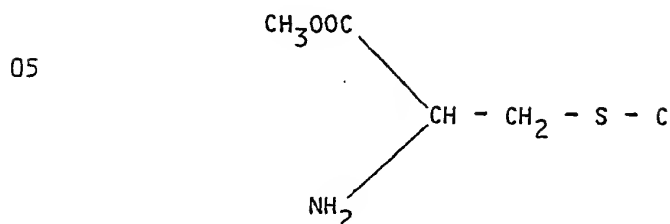
- x est égal à 1 ou à 2

Le substitut en R_2 constitue un moyen de protection des fonctions thiols de résidus cystéiques, afin d'éviter que celles-ci ne réagissent sur les $COOH$ activés du collagène, lors de leur mise en contact.

Suivant une disposition préférée de la présente invention, on utilise, à titre de résidu cystéique, la cystine diméthylester :



et plus préférentiellement encore, la S-triphényl méthyl cystéine méthylester :



10 Dans ce dernier cas, le blocage des fonctions thiols s'effectue par mise en présence de cystéine méthylester avec du triphényl méthanol et du BF₃ étherate, à une température supérieure à 50°C. Le résidu cystéique récupéré se présente sous la forme d'une huile jaunâtre cristallisable.

15 Pour la mise en oeuvre du greffage du résidu cystéique sur le collagène activé, le milieu réactionnel obtenu à l'issue de l'étape c peut être utilisé directement.

La réaction se déroule, au moins en partie, à une température inférieure ou égale à - 5°C.

20 Le collagène substitué par le résidu cystéique, constituant un précurseur inerte du collagène modifié que l'on cherche à obtenir, est récupéré par précipitation par exemple à l'aide d'acétate d'éthyle. Il se trouve ainsi sous la forme d'un intermédiaire réactionnel nouveau et stable.

25 L'étape e de la première forme de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention consiste en une reconstitution des fonctions thiols, par élimination du groupement protecteur. Celle-ci peut être réalisée par réduction à l'aide d'un agent réducteur choisi, de préférence, parmi les mercaptans et/ou les sels réducteurs et/ou les composés réducteurs organiques.

30 Le mercaptan peut être le mercaptoéthanol, l'acide mercaptoacétique, la mercaptoéthylamine, le benzylmercaptan, le thiocrésol ou le dithiothréitol.

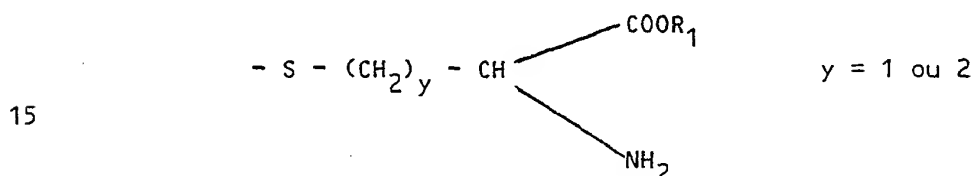
35 Comme sel réducteur, il est possible de retenir, par exemple, le borohydrure de sodium ou l'hydrogénosulfite de sodium.

Les phosphines, telles que la tributylphosphine convient bien à titre de composé réducteur organique.

On utilise avantageusement des mélanges d'agent réducteur et, de manière préférée, une combinaison de mercaptoéthanol/
05 borohydrure de sodium.

La réduction peut être réalisée en milieu aqueux basique ou neutre, dans des solvants organiques ou dans des mélanges de solvants organiques en présence ou en absence d'eau.

Cette étape e de réduction est mise en oeuvre, notamment,
10 lorsque le groupement R_2 du résidu cystéique greffé sur le précurseur inerte est du type :



Le produit réduit est stabilisé par passage en milieu acide à pH inférieur à 4. Il est stocké sous forme de poudre
20 obtenue, par exemple, par lyophilisation, dans une atmosphère azotée à l'abri de l'oxygène.

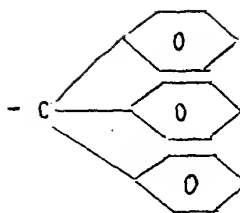
Dans la deuxième forme de mise en oeuvre du procédé suivant l'invention, l'étape e_1 consiste en une oxydation à l'aide d'un agent oxydant, tel que l'iode en solution alcoolique, par
25 exemple méthanolique, dans un milieu réactionnel à base de solvant polaire organique aprotique, caractéristique du procédé suivant l'invention, tel que le DMF. On obtient du collagène réticulé par des ponts disulfure.

Pour obtenir le collagène réticulable à fonctions SH
30 libres ou substituées, il convient de mettre en oeuvre l'étape f_1 de réduction de ce collagène réticulé.

Cette réduction est du type de celle mise en oeuvre dans le cadre de l'étape e décrite ci-dessus.

Les étapes e_1 et f_1 sont mises en oeuvre lorsque le
35 précurseur inerte présente un résidu cystéique ayant un

substituant R_2 du type :



10 Selon une caractéristique avantageuse de la présente invention, les quantités des différents réactifs intervenant dans le procédé sont choisies de telle sorte que le collagène modifié, autoréticulable obtenu comprenne une proportion de fonctions thiols libres supérieure ou égale à 3.

15 Sous un autre aspect, l'invention concerne, également, un procédé d'obtention d'un collagène réticulé, insoluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, consistant à mettre en oeuvre les étapes a, b, c, d, et e₁ du procédé décrit ci-dessus.

20 Comme il a été vu ci-avant, le principe du procédé suivant l'invention consiste à potentialiser les fonctions de la chaîne peptidique, que sont les NH_2 et les OH , à l'aide d'un composé d'espacement, de manière à pouvoir greffer sur celles-ci, ainsi que sur des fonctions $COOH$ libres d'origine, des résidus cystéiques suivant des degrés de substitution variables et modulables à souhait.

25 Les résidus cystéiques greffés sur les chaînes de collagène sont oxydés pour donner des ponts disulfure entre ces molécules. Cette réaction conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel, insoluble dans les milieux physiologiques et soluble dans des milieux réducteurs capables de réduire les ponts disulfure.

30 Le nombre de liaisons formées entre ces différentes molécules dépend du degré de substitution et des conditions d'oxydation.

35 S'agissant du taux de réticulation, il est déterminant au regard de la résistance mécanique et de la biodégradabilité des

réticulats obtenus.

Le collagène réticulable et le collagène réticulé suivant l'invention ne contiennent que des molécules ou dérivés de nature biologique, susceptibles d'être facilement métabolisés pour
05 donner des composés reconnus comme métabolites par les organismes animaux.

Les réactifs utilisés lors des modifications chimiques sont, soit transformables en produits non toxiques, soit facilement éliminables par des procédés non dénaturants, comme la dialyse par
10 exemple.

Le collagène modifié sous forme réduite ne contient pas de fonctions activées résiduelles et le collagène réticulé oxydé ne peut contenir que des fonctions thiols n'ayant pas réagi. Ces fonctions ne sont pas toxiques, puisque naturellement présentes
15 dans un grand nombre de protéines animales.

Les procédés d'oxydation ne font pas appel à des substances toxiques, ni à des conditions agressives pour les tissus vivants.

L'invention offre la possibilité très appréciable de
20 pouvoir contrôler l'ensemble des phénomènes de réticulation du collagène, dont notamment la cinétique et le taux. Ceci est particulièrement utile pour la réalisation d'objets moulés ou extrudés, du type implants, prothèses, lentilles épicronéennes, etc.

Un autre avantage non négligeable de l'invention est
25 qu'elle permet de moduler les propriétés mécaniques, en contrôlant le nombre de résidus cystéiques introduits par unité de masse du collagène. Il est clair qu'au niveau industriel, une telle souplesse amènera une très bonne reproductibilité des produits
30 finis. Il est également possible de cibler précisément une classe de produits réticulés conformes au cahier des charges, établi en fonction de l'application visée et définissant les contraintes mécaniques et les cinétiques de biodégradation souhaitées.

Les produits et les procédés suivant l'invention
35 trouvent des applications immédiates, d'une part, en médecine

humaine et, d'autre part, dans le domaine de la biologie.

En médecine humaine, il peut s'agir d'implants, par exemple ophtalmologiques, de prothèses, par exemple osseuses, de pansements sous forme de films ou de feutres, de tissus artificiels (épiderme, vaisseaux, ligaments, os), de systèmes de bioencapsulation (microsphères, microcapsules) permettant la libération contrôlée de principes actifs in vivo, de revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables ou bien encore de fils de suture.

En biologie, les matériaux suivant l'invention constituent d'excellents supports pour cultures cellulaires bidimensionnelles (films) et tridimensionnelles (feutres).

Le collagène réticulé selon l'invention peut être utilisé seul ou en mélange avec des polymères biologiques modifiés ou non ou des polymères synthétiques.

D'autres avantages et variantes de la présente invention ressortent bien de l'exemple décrit ci-après, de la deuxième forme de mise en oeuvre du procédé suivant l'invention comprenant les étapes a à d, e₁ et f₁.

Etape a : Solubilisation de l'atélocollagène de départ :

25 g d'atélocollagène sont mis en suspension dans 230 ml de méthanol. Après gonflement pendant 15 secondes, 230 ml de DMSO sont ajoutés et le milieu est agité jusqu'à dissolution complète à 20° C. Le milieu est alors filtré sur filtre 45 microns et le méthanol est évaporé sous vide (environ 0,3 m bars).

Etape b : Activation et carboxylation du collagène solubilisé :

A la solution collagénique obtenue à l'issue de l'étape a et exempte de méthanol, sont ajoutés 30 g (30 mmoles) d'anhydride succinique, puis après dissolution complète 23 ml (0,165 mmoles) de triéthylamine, goutte à goutte en 10 minutes. La température est maintenue à 25° C par un système externe de thermostatisation. La solution obtenue est agitée pendant 3 à 6 heures, puis le collagène succinylé est précipité par addition de 500 ml d'acétate d'éthyle. Le précipité est ensuite lavé par deux bains successifs de 250 ml

d'acétone pendant 30 minutes. Le résidu solide obtenu est mis en suspension dans 250 ml d'eau distillée et le milieu est amené et maintenu à pH 8 par NaOH 6N sous agitation jusqu'à dissolution complète. A partir de cette solution, le collagène succinylé peut
05 être précipité en présence de chlorure de sodium, 10 % par acidification jusqu'à pH 2 à l'aide d'acide chlorhydrique 6N. Le précipité obtenu est alors remis en suspension dans de l'eau et dialysé contre de l'eau distillée maintenue à pH 2. La solution obtenue à l'issue de cette étape est lyophilisée pour donner 27 g
10 de collagène succinylé sur 20 % des acides aminés.

Le taux de succinylation est déterminé par deux techniques :

- Dosage enzymatique de l'acide succinique après hydrolyse du collagène en milieu basique,
- 15 - Dosage potentiométrique des fonctions carboxyliques.

Etapas c et d : Activation du collagène succinylé et greffage de S-Triphénylméthyl Cystéine Méthyl Ester :

Pour la mise en oeuvre de l'étape c, 10 g de collagène succinylé à 20 % (acidité totale 27,5 mmoles) sont dissous dans 180
20 ml de DMF anhydre (5 à 18 heures), puis sont ajoutés sous forte agitation 4,2 ml (30,10 mmoles) de triéthylamine. L'ensemble est refroidi à -5/-10°C, puis 3,2 ml (33,6 mmoles) d'éthylchloroformate sont ajoutés goutte à goutte en 20 minutes environ. Après
25 15 minutes d'agitation, le collagène succinylé est activé et l'étape c prend fin. Pour débiter l'étape d, 18 g (43,7 mmoles) de S-Triphénylméthyl-Cystéine Méthyl ester sont ajoutés en une seule fois et le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à -5/-10°C, puis 16 heures à 20-25°C. Le dérivé collagénique est alors
30 précipité par 200 ml d'acétate d'éthyle et purifié deux fois par dissolution dans du DMSO et reprécipitation par de l'acétate d'éthyle. Le résidu solide est alors lavé par du méthanol, puis séché sous vide pour donner 15,5 g de dérivé collagénique soluble dans le DMSO et le DMF et insoluble dans l'eau quel que soit le pH.

35

Etape e₁ : Déblocage du résidu cystéique - obtention de
collagène réticulé par des ponts disulfure :

15,5 grammes du collagène précédent sont dissous dans
200 ml de DMF sous agitation pendant 16 heures, puis 30 ml de
05 méthanol sont ajoutés. Le milieu est alors agité vigoureusement
pendant l'ajout goutte à goutte de 40 ml de DMF contenant 5,5 g
(21,6 mmoles) d'iode. Un gel se forme rapidement et, après
addition totale de la solution d'iode, le milieu est laissé au
repos pendant 2 heures, puis il est mélangé à une solution de
10 thiosulfate de sodium jusqu'à décoloration complète. Le précipité
unicolore est alors lavé par de l'eau (3 x 200 ml), par de
l'acétate d'éthyle (3 x 100 ml), puis par du méthanol (2 x 200
ml). Après séchage sous vide, 12 grammes de produit sont obtenus.
Le degré de substitution du collagène obtenu est estimé à 11
15 résidus cystéine pour 100 acides aminés, par dosage des
groupements thiols libérés après hydrolyse en milieu basique
réducteur.

Etape f₁ : Transformation par réduction du collagène
réticulé en collagène modifié porteur de
20 fonctions thiols libres, stabilisées :

4 grammes de collagène réticulé par des ponts disulfure,
sous forme de poudre ou de fibres de l'étape e₁, sont dispersés dans
60 ml d'une solution constituée par 40 ml de DMF et 20 ml d'eau et
contenant 7 mmoles de mercaptoéthanol. La suspension est agitée
25 pendant 30 minutes à température ambiante (18-25° C), puis 11
mmoles de borohydrure de sodium en solution sont ajoutées dans 5 ml
de DMF. Le milieu est agité jusqu'à dissolution complète du dérivé
collagénique (1 à 4 h). La solution est alors neutralisée par
addition lente d'acide acétique pur (0,65 ml) ou d'acide
30 chlorhydrique 6N (2 ml), puis dialysée sous atmosphère inerte
contre de l'eau distillée maintenue à pH inférieur à 5,
préférentiellement 2-4 par addition d'acide chlorhydrique 6N. La
solution obtenue est alors lyophilisée pour donner un produit très
soluble dans l'eau à pH supérieur à 5 et dans les solvants polaires
35 aprotiques.

Le collagène réticulable obtenu peut redonner un réticulat par action d'un environnement oxydant doux (O_2 de l'air) ou fort (iode méthanolique).

05

10

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS :

1 - Collagène modifié, réticulable, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, et contenant des fonctions thiols libres ou substituées portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, lesdits résidus étant au moins en partie fixés au collagène par l'intermédiaire de composés d'espacement.

2 - Collagène modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé d'espacement est un produit de nature carboxylique, et de préférence, un acide dicarboxylique apte à former un anhydride cyclique.

3 - Collagène modifié selon la revendication 2, caractérisé en ce que le composé d'espacement est un acide dicarboxylique choisi dans le groupe non limitatif de composés suivants :

- acide succinique, glutarique, phtalique, itaconique, citraconique et maléique, ainsi que leurs dérivés.

4 - Collagène modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que les résidus porteurs des fonctions thiols libres ou substituées sont choisis parmi le groupe non limitatif de composés suivants : cystéine, cystine, homocystéine.

5 - Collagène réticulé, insoluble, caractérisé en ce que ses pontages intercaténaires sont constitués par des ponts disulfure formés par des résidus cystéiques au moins en partie fixés au collagène par l'intermédiaire de composés d'espacement.

6 - Collagène réticulé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir du collagène selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

7 - Procédé d'obtention d'un collagène modifié, réticulable ou autoréticulable, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, et contenant des fonctions thiols libres ou substituées, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes successives suivantes :

- a - Solubilisation du collagène de départ dans au moins un solvant organique polaire aprotique,

- b - acylation et carboxylation du collagène solubilisé,
- c - activation des fonctions carboxyles libres du collagène,
- d - réaction du collagène activé avec un résidu cystéique à fonctions(s) thiol(s) bloquée(s), de manière à obtenir un précurseur inerte du collagène modifié visé.

8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape supplémentaire suivante :

- e - activation directe du précurseur inerte, de préférence par réduction, conduisant au collagène modifié porteur de fonctions thiols libres ou substituées, stabilisées.

9 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes supplémentaires suivantes :

- e₁ - activation indirecte du précurseur inerte, de préférence par oxydation, conduisant à du collagène réticulé par l'intermédiaire de ponts de disulfure intercaténaires,
- f₁ - transformation, de préférence par réduction, du collagène réticulé en collagène modifié porteur de fonctions thiols libres ou substituées, stabilisées.

10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que l'étape a est réalisée à l'aide d'un auxiliaire de solubilisation.

11 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que le solvant polaire aprotique, mis en oeuvre à l'étape a, est choisi parmi la liste non limitative de produits suivants : DiMéthylSulfOxyde, DiMéthylAcétamide, DiMéthylFormamide, N-Méthylpyrrolidone, seuls ou en mélange.

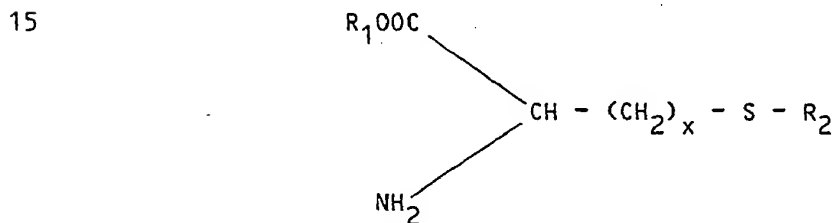
12 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, caractérisé en ce que l'étape b est réalisée à l'aide d'un anhydride d'acide dicarboxylique, choisi parmi la liste non limitative suivante d'anhydrides d'acides dicarboxyliques ou de

leurs dérivés : succinique, glutarique, phtalique, itaconique, citraconique et maléique, l'anhydride succinique étant préféré.

13 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que l'étape b est réalisée en présence d'une base organique, de préférence du type tertiaire, telle que la triéthylamine, ou bien encore la N-méthyl ou N-éthylmorpholine.

14 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce que l'étape c est effectuée à l'aide d'un halogénure d'acide, et de préférence, d'un chlorure d'acide.

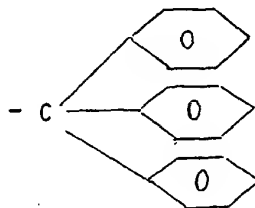
15 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 15, caractérisé en ce que l'étape d consiste à faire réagir le collagène à fonctions carboxyles activées de l'étape c, avec un résidu cystéique de formule générale :



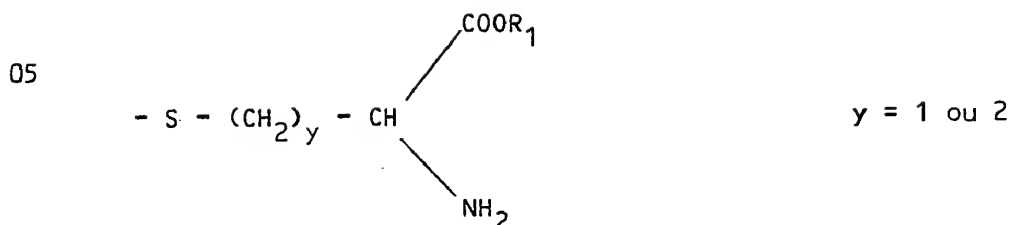
dans laquelle :

* R_1 est une chaîne carbonée aliphatique et/ou aromatique et/ou cyclique, de préférence alkylique, alkylénique, arylique, aralkylique ou aralkylénique, et plus préférentiellement encore, méthylique, éthylique ou allylique ;

* R_2 est une chaîne carbonée éventuellement soufrée, aliphatique et/ou aromatique et/ou cyclique, de préférence choisie parmi les groupements de formule suivante :



ou



10

- et x est égal à 1 ou à 2

15 **16** - Procédé d'obtention d'un collagène réticulé, insoluble, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en oeuvre les étapes a, b, c, d et e₁ du procédé selon la revendication 7 et la revendication 9.

20 **17** - Produit intermédiaire obtenu lors de la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 16, caractérisé en ce qu'il est constitué par du collagène ayant réagi avec un diacide carboxylique, par l'intermédiaire d'au moins une partie de ses fonctions réactives OH et NH₂, et en ce qu'il comporte de 4 à 22 greffons carboxyliques pour cent acides aminés.

18 - Produit intermédiaire selon la revendication 17, caractérisé en ce que le diacide est l'acide succinique ou l'acide glutarique.

25 **19** - Application du collagène modifié, réticulable selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou de celui obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 15, ou du collagène réticulé selon la revendication 5 ou 6, ou bien encore de celui obtenu par le procédé selon la

30 revendication 16, à la préparation d'articles utilisables en médecine, du type implants, prothèses, peaux artificielles, pansements, revêtements de prothèses ou autres.

35

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9207692
FA 474271

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	ANGEW. CHEM. vol. 74, no. 22, 1962, page 904 F. SCHADE & H. ZAHN 'Einbau von Cystin-Brücken in Kollagen' * le document en entier *	1,5
D,A	EP-A-0 049 469 (DR. RUHLAND NACHF. GMBH) * page 6, ligne 5 - ligne 23; revendications *	1,19
X	EP-A-0 191 994 (KOKEN CO. LTD.) * le document en entier *	17,18
X	US-A-4 294 241 (T. MIYATA) * le document en entier *	17,18
A	EP-A-0 330 389 (KELMAN C.D.) -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C08H C09H C08L A61L
Date d'achèvement de la recherche 22 FEVRIER 1993		Examineur MAZET J.-F.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 Q1.42 (P0413)